

5000



07 Rec'd PCT/PTO

1 OCT 2001

A34638-PCT-USA - 072667.0176

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Fritig et al.  
Serial No. : 09/937,204  
Filed : September 21, 2001  
For : INDUCIBLE COMTII PROMOTER, CHIMERA GENE CONTAINING  
SAME AND TRANSFORMED PLANTS

CLAIM OF PRIORITY

I hereby certify that this paper is being deposited with the United States  
Postal Service as First Mail in an envelope addressed to: Assistant  
Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231

October 9, 2001  
Date of Deposit

Janet M. MacLeod  
Attorney Name

Janet M. MacLeod  
Signature

35,263  
PTO Registration No.

October 9, 2001  
Date of Signature

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

A claim of priority is hereby made for the above-identified application under the  
provisions of 35 U.S.C. § 119 based on French Application Nos. 99/03700 filed March 22, 1999  
and 99/07646 filed June 11, 1999.

Respectfully submitted,

Janet M. MacLeod  
Janet M. MacLeod  
Patent Office Reg. No. 35,263

Attorney for Applicants  
(212) 408-2597

2002 150 11, 01/11/2001

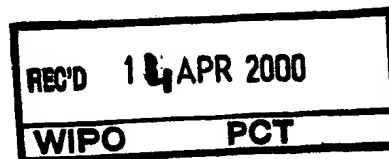
PCT INITIAL PROCESSING

OCT 17 2001

RECEIVED



FR00/714



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 07 FEV. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', enclosed within a large, loopy oval shape.

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

|  |                               |  |   |
|--|-------------------------------|--|---|
| DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>11 JUIN 1999</b><br>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>9907646</b><br>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>LY</b><br>DATE DE DÉPÔT <b>11 JUIN 1999</b>  |                               | 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE<br>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE<br><br><b>RHONE-POULENC AGRO</b><br><b>Franck TETAZ - DPI</b><br><b>B.P. 9163</b><br><b>69263 LYON CEDEX 09</b> |   |
| 2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle<br><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire<br><input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen<br><input checked="" type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention |                               | n° du pouvoir permanent <b>6229</b> références du correspondant <b>PH 99014 G1</b> téléphone <b>33 4 72 85 2592</b><br><input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° _____ date _____                     |   |
| Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat<br>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non   |                               |  |   |
| Titre de l'invention (200 caractères maximum)<br><br><b>"Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées"</b>  |                               |  |   |
| 3 DEMANDEUR (S) n° SIREN _____ code APE-NAF _____<br>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination<br><br><b>RHONE-POULENC AGRO</b>   |                               | Forme juridique<br><br><b>S.A.</b>   |   |
| Nationalité (s) <b>française</b><br>Adresse (s) complète (s)<br><br><b>14-20 rue Pierre Baizet</b><br><b>69009 LYON</b>  |                               | Pays<br><br><b>France</b>  |   |
| En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>   |                               |  |   |
| 4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée   |                               |  |   |
| 5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission  |                               |  |   |
| 6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE  |                               |  |   |
| pays d'origine<br><br><b>FRANCE</b>  | numéro<br><br><b>99 03700</b> | date de dépôt<br><br><b>22 Mars 1999</b>   | nature de la demande<br><br><b>Brevet d'invention</b> |
| 7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° _____ date _____  |                               | n° _____ date _____  |   |
| 8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE<br>(nom et qualité du signataire)<br><br><b>Franck TETAZ</b>   |                               | SIGNATURE DU DÉPOSÉ À LA RÉCEPTION <b>N. AMERIS</b><br>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI   |   |

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9907646

(N/Réf : PH 99014 G1)

TITRE DE L'INVENTION :

"Promoteur inductible CONTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées"

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

Franck TETAZ  
RHONE-POULENC AGRO

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

TOQUIN Valérie  
1 rue Henri Barbusse  
Saint Martin des Champs  
29600 MORLAIX, France

GEOFFROY Pierrette  
10 rue Fischart  
67000 STRASBOURG, France

FRITIG Bernard  
6 rue du Hohwald  
67460 SOUFFLELWEYERSHEIM, France

LEGRAND Michel  
3 rue des Roses  
67370 PFETTISHEIM, France

KAUFFMANN Serge  
3 cour du Moulin Zorn  
67000 STRASBOURG, France

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 11 Juin 1999



Franck TETAZ

**Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées**

La présente invention concerne une nouvelle séquence de régulation promotrice inductible en réponse à une blessure, mécanique ou chimique, ou en réponse à une agression par un agent pathogène, notamment bactérien, fongique ou viral, ou par un insecte ou un nématode.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant la séquence de régulation promotrice selon l'invention qui contrôle l'expression d'une séquence codante hétérologue, hétérologue signifiant ici une séquence codante différente de la séquence codante native.

La présente invention concerne également un organisme hôte comprenant ledit gène chimère, les plantes transformées le comprenant et les semences (graines) desdites plantes transformées.

Il est connu de l'état de la technique que certains gènes, silencieux en l'absence d'agression, ne sont activés que par une agression tant mécanique que chimique et/ou en réponse à une agression par un agent pathogène, un insecte ou un nématode. De tels gènes et leurs facteurs d'activation sont notamment décrits dans le brevet US 5 670 349.

Ces différents modes de défense sont généralement liés à une régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans les mécanismes de défense des plantes par induction de leurs séquences de régulation promotrices. On connaît plusieurs séquences de régulation inductibles comme les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB, tous ces promoteurs étant rappelés avec les références des publications correspondantes par le Tableau 3 du brevet US 5 670 349. On connaît également le promoteur HMG2 décrit dans ce même brevet US 5 670 349, comme le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'acide cyclopropane carboxylate synthase (ACC synthase) de pomme décrits dans la demande de brevet WO 98/45445.

La présente invention concerne un nouveau fragment d'acide nucléique, en particulier isolé, comprenant un promoteur de plante (ou séquence de régulation promotrice) inductible, ledit promoteur inductible étant constitué par le promoteur d'un

gène d'*O*-méthyltransférase de classe II (ci-après COMT II) de plante.

Les gènes d'*O*-méthyltransférase de classe II, dont le gène d'acide caféique-*O*-méthyltransférase de classe II, de plantes sont silencieux (inactifs) en l'absence de toute agression puisque les plantes non agressées ne l'expriment pas, ou pour le moins à des  
 5 niveaux indétectables par les méthodes d'analyse usuelles. Ainsi, le messager de la COMT II est indétectable par la technique de " Northern blot " dans différents tissus d'une plante saine non traitée, comme par exemple le tabac (Pellegrini & al., 1993). Cette COMTII et son promoteur sont activés (ou induits) par les blessures, les infections  
 10 virales, les agressions aux rayons UV, ou aux agressions chimiques par différents produits comme le benzothiazole (BTH), le méthyle jasmonate ou des éliciteurs d'origine végétale comme la pectine.

De manière avantageuse, le fragment d'acide nucléique isolé selon l'invention est constitué par un promoteur de COMTII de plante.

Par COMTII de plante, on entend selon l'invention toute OMT de plante qui n'est  
 15 pas exprimée dans les plantes saines non traitées, mais qui l'est à la suite d'une agression mécanique, chimique, par un pathogène, un insecte ou un nématode.

Par plante d'origine de la COMTII, on entend selon l'invention tout organisme pluricellulaire différencié capable de photosynthèse, qu'elle soit monocotylédone ou dicotylédone, comme par exemple le riz, le blé, l'orge, le tournesol, le maïs, le tabac, le  
 20 colza, le soja ou *Arabidopsis thaliana*.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la COMT II est une COMT de plante dicotylédone, de préférence de tabac.

Par promoteur, on entend selon l'invention la région non codante d'un gène impliqué dans la liaison avec l'ARN polymérase et d'autres facteurs qui sont  
 25 responsables de l'initiation et de la modulation de la transcription conduisant à la production d'un transcrit d'ARN. Il s'agit plus particulièrement de toute séquence en 5' du site d'initiation de la traduction ou codon " start " (ATG) de la séquence codante de la COMTII permettant la transcription et l'expression de ladite séquence codante.

Le promoteur selon l'invention comprend avantageusement une séquence de plus  
 30 de 600 nucléotides en amont de l'ATG de la COMT II, de préférence de plus de 700, de plus de 800 voire de plus de 900 nucléotides en amont de l'ATG, plus préférentiellement de plus de 1000 nucléotides en amont de l'ATG, encore plus



préférentiellement de plus de 1200 nucléotides en amont de l'ATG. Les promoteurs comprenant plus de 1500 nucléotides en amont de l'ATG de la COMTII font également partie de la présente invention.

Le promoteur comprend un site d'initiation de la transcription. Le site d'initiation  
5 de la transcription est généralement situé à moins de 100 nucléotides en amont de l'ATG, avantageusement à environ 90 nucléotides en amont.

De manière avantageuse, l'extrémité 3' du promoteur COMTII selon l'invention est située entre le site d'initiation de la transcription et l'ATG. De préférence, l'extrémité 3' du promoteur COMTII est située entre 10 et 50 nucléotides en aval du site  
10 d'initiation de la transcription, plus préférentiellement entre 20 et 40 nucléotides en aval, encore plus préférentiellement entre 20 et 30 nucléotides en aval.

Le promoteur COMTII selon l'invention comprend également au moins une boîte TATA et au moins une boîte CAT. La boîte TATA est généralement située à moins de 50 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, à environ 40 nucléotides  
15 en amont. La boîte CAT est généralement située à moins de 100 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, de préférence à environ 100 nucléotides et/ou 80 nucléotides en amont. De manière avantageuse, le promoteur comprend deux boîtes CAT.

Le promoteur selon l'invention comprend également des éléments régulateurs  
20 impliqués dans l'expression de gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes et des gènes associés à la défense, en particulier au moins une boîte A et/ou au moins une boîte L et/ou au moins une boîte L inversée et/ou au moins une boîte P et/ou au moins une boîte W inversée. La boîte A comprend la séquence suivante CCGTCC. Elle est généralement située à moins de 410 nucléotides du site d'initiation de la transcription.  
25 La boîte L comprend la séquence suivante CTTCAACAACCAACC. Elle est généralement située à moins de 180 nucléotides du site d'initiation de la transcription. La première boîte L inversée comprend la séquence suivante GTTAGGTGAAG. Elle est généralement située à moins de 1000 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes L  
30 inversées, l'une à environ 970 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription et l'autre à environ 440 nucléotides en amont. La deuxième boîte L inversée comprend la séquence suivante TGTTAGGTGTGTGTTT. La boîte P

comprend la séquence suivante CACACCAACTCCCA. Elle est généralement située à moins de 750 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte W inversée comprend la séquence suivante GGTCAA. Elle est généralement située à moins de 1200 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription.

- 5   Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes W inversées, l'une à environ 1110 nucléotides en amont et l'autre à environ 210 nucléotides en amont.

- Le promoteur selon l'invention comprend également au moins une boîte E et/ou au moins une boîte G et/ou au moins une boîte GT. La boîte E comprend la séquence  
 10   suivante TTCCATCAAG. Elle est généralement située à moins de 110 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte G comprend la séquence suivante CCACGT. Elle est généralement située à moins de 600 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte GT comprend la séquence suivante GGTTAA. Elle est généralement située à moins de 450 nucléotides en amont du site d'initiation de  
 15   la transcription. Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes GT, l'une à environ 400 nucléotides en amont et l'autre à environ 280 nucléotides en amont.

- Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, le promoteur selon l'invention est constitué par le promoteur COMTII de tabac défini par la séquence  
 20   nucléotidique en amont de l'ATG représentée par l'identificateur de séquence 1 (SEQ ID NO 1), de préférence la séquence comprise entre les nucléotides 557 et 1795 de l'identificateur de séquence n° 1, les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites séquences et leurs séquences homologues.

- Par « séquence capable de s'hybrider de manière sélective », on entend selon  
 25   l'invention les séquences qui s'hybrident avec les séquences ci-dessus à un niveau supérieur au bruit de fond de manière significative. Le bruit de fond peut être lié à l'hybridation d'autres séquences d'ADN présentes, notamment d'autres ADNc présentes dans une banque d'ADNc. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences définies par les  
 30   séquence ID ci-dessus selon l'invention est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Le niveau d'interaction peut être mesuré par exemple, par marquage de la sonde

avec des éléments radioactifs, comme le  $^{32}\text{P}$ . L'hybridation sélective est généralement obtenue en employant des conditions de milieu très sévères (par exemple NaCl 0,03 M et citrate de sodium 0,03 M à environ 50°C-60°C). L'hybridation peut bien entendu être effectuée selon les méthodes usuelles de l'état de la technique (notamment Sambrook & al., 1989, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*).

Par séquence homologue, on entend selon l'invention toute séquence comprenant plus de 70 % d'homologie, préférentiellement plus de 80 % d'homologie, encore plus préférentiellement plus de 90 % d'homologie, et qui conserve les éléments fonctionnels du COMTII lui conférant ses propriétés de promoteur inductible. Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre les séquences d'acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul & al., 1993, *J. Mol. Evol.* 36 :290-300 ; Altschul & al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215 :403-10).

L'isolement, le clonage et la caractérisation des promoteurs COMT II à partir des gènes de COMT II se fait selon les méthodes expérimentales usuelles de l'homme du métier pour isoler, cloner et caractériser un promoteur, abondamment décrites dans la littérature.

L'isolement et le clonage d'un gène COMT II se fait par analyse d'une banque génomique préparée à partir de l'ADN de la plante d'intérêt. L'ADN génomique est coupée par une ou plusieurs enzymes de restriction appropriées et introduit dans un vecteur adéquat pour constituer, par des méthodes connues de l'homme du métier, une banque contenant l'ensemble du DNA génomique de la plante (Ausubel et al., 1998; Sambrook et al., 1989).

Le ou les clones renfermant un gène COMT II est (sont) isolé(s) grâce à une sonde nucléotidique. La séquence de la sonde est, soit déduite de la séquence protéique si l'enzyme a été purifiée (en suivant son activité, par exemple), soit préparée à partir d'un clone de cDNA issu d'une banque. Cette banque de cDNA est préparée à partir de mRNA extrait de tissus traités de façon à induire l'expression du gène COMT II (par la blessure, l'infection ou un traitement chimique comme décrit dans les exemples ou les figures 1-5). La banque de cDNA est ensuite criblée par des anticorps dirigés contre une protéine COMT II (de tabac par exemple) ou par une sonde nucléotidique déduite de la protéine COMT II de la plante considérée ou déduite des séquences conservées chez les

COMT de plantes. Le cDNA ainsi isolé est caractérisé par sa séquence nucléotidique ou par l'activité enzymatique de la protéine recombinante obtenue après expression du cDNA dans un organisme procaryote ou eucaryote.

Les séquences non codantes du cDNA (3' et/ou 5') sont utilisées pour sélectionner,  
 5 par PCR, en conditions très sélectives, le ou les clones génomiques renfermant le gène COMT II exprimé lors du traitement utilisé pour construire la banque cDNA. Les séquences promotrices sont alors être isolées par PCR ou toute autre méthode appropriée bien connue de l'homme du métier.

Sur la base des informations contenues dans la présente demande de brevet pour le  
 10 promoteur COMTII de tabac, l'homme du métier sera à même d'identifier d'autres promoteurs COMTII d'autres espèces végétales une fois le gène COMTII identifié et cloné selon les méthodes usuelles, notamment celles décrites ci-dessus.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le  
 15 sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante et une séquence de régulation en 3', la séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur COMT II selon l'invention défini auparavant.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés  
 20 tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave,  
 25 le tabac, le coton, etc.

Comme séquence de régulation en 5', on peut utiliser le promoteur COMTII selon l'invention seul ou associé à au moins une partie d'un promoteur d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits constitutifs d'origine  
 30 bactérienne, virale ou végétale ou encore des promoteurs dits lumière dépendants comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose- biscoxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante ou tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. Parmi

les promoteurs d'origine végétale on citera les promoteurs d'histone tels que décrits dans la demande EP 0 507 698, ou le promoteur d'actine de riz (US 5,641,876). Parmi les promoteurs d'un gène de virus de plante, on citera celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), ou le promoteur du circovirus (AU 689 311).

5 On peut encore utiliser le promoteur COMTII selon l'invention en association avec au moins une partie d'un promoteur spécifique de régions ou de tissus particuliers des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines ([22] Datla, R. & al., *Biotechnology Ann. Rev.* (1997) 3, 269-296), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la phaseoline, de la glutenine, de l'héliantinine (WO 92/17580),  
10 de l'albumine (WO 98/45460) ou de l'oélosine (WO 98/45461).

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec le promoteur COMTII selon l'invention, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du  
15 tabac (VMT) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (VET) décrit par Carrington & Freed.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par  
20 exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

La séquence codante du gène chimère selon l'invention comprend une séquence codante pour un gène rapporteur, comme la séquence codante GUS, ou une séquence codante pour une protéine d'intérêt. Au regard du mode d'induction du promoteur selon l'invention, blessure, infection virale ou réponse à des éliciteurs, la protéine d'intérêt est  
25 avantageusement une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux maladies ou aux insectes.

Parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux maladies on citera notamment les chitinases, les glucanases, l'oxalate oxydase, toutes ces protéines et leurs séquences codantes étant largement décrites dans  
30 la littérature, ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines

comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

5 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines (Kamoun & al., 1993 ; Panabières & al., 1995). De manière préférentielle, le peptide éliciteur fongique est la mégaspermine. La mégaspermine et sa séquence codante est représentée par l'identificateur de séquence n° 13 (SEQ ID 13). De manière plus  
10 préférentielle, le gène chimère selon l'invention comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur COMT II et une séquence codante pour la mégaspermine comprend la séquence d'ADN représentée par l'identificateur de séquence n° 14 (SEQ ID 14).

Parmi les protéines d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux  
15 insectes, on citera plus particulièrement les protéines *Bt* largement décrites dans la littérature et bien connues de l'homme du métier. On citera aussi les protéines extraites de bactéries comme *Photorabidus* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le  
20 sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante pour un éliciteur et une séquence de régulation en 3', la séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur inductible.

De manière préférentielle, l'éliciteur est une élicitine, plus préférentiellement la mégaspermine telle que définie ci-dessus.

25 Le promoteur inductible est avantageusement choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène *vspB* (US 5 670 349, Tableau 3), le promoteur HMG2 (US 5 670 349), le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de  
30 l'amino cyclopropane carboxylate syntase (ACC synthase) de pomme (WO 98/45445).

La présente invention concerne également un vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation des cellules végétales ou des plantes contenant au

moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de répllication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation  
5 sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature. Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un  
10 plasmide.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, le gène chimère selon l'invention peut être employé en association avec un gène marqueur de sélection, soit dans un même vecteur, les deux gènes étant associés de manière convergente, divergente ou colinéaire, ou encore dans deux vecteurs employés simultanément pour la  
15 transformation de l'organisme hôte. De tels gènes marqueurs et leur utilisation pour la transformation des plantes sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Parmi les gènes codant pour des marqueurs de sélection, on peut citer les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes de tolérance aux herbicides (bialaphos, glyphosate ou isoxazoles), des gènes codant pour des enzymes rapporteurs facilement  
20 identifiables comme l'enzyme GUS, des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 ou  
25 WO 97/04103.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des cellules végétales par intégration au génome des dites cellules végétales d'au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les  
30 références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des

tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*. D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG. L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a encore pour objet les cellules végétales ou plantes transformés et contenant un gène chimère défini ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus. Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes transformées pouvant être obtenues selon l'invention peuvent être du type monocotylédones telles que par exemple les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs ou dicotylédones comme par exemple le tabac, la soja, le colza, le coton, le tournesol, la betterave, le trèfle, etc.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent contenir d'autres gènes d'intérêt, conférant aux plantes de nouvelles propriétés agronomiques. Parmi les gènes conférant de nouvelles propriétés agronomiques aux plantes transformées, on peut citer les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, ceux conférant une tolérance à certains insectes, ceux conférant une tolérance à certaines maladies. De tels gènes sont



notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128. On peut également citer les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les

5 graines desdites plantes. On citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés ([1]; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ; WO 94/20828 ; WO 92/14822). Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire, permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité liés à une

10 surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des gènes codant pour des peptides riches en acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou antifongique. On citera plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute origine, et plus particulièrement les peptides lytiques suivants

15 : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

Ces autres gènes d'intérêt peuvent être combinés au gène chimère selon l'invention soit par croisement conventionnel de deux plantes contenant chacune l'un des gènes (la première le gène chimère selon l'invention et la seconde le gène codant

20 pour la protéine d'intérêt) soit en effectuant la transformation de cellules végétales d'une plante contenant le gène codant pour la protéine d'intérêt avec le gène chimère selon l'invention.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

25 Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie

30 des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al ou dans Sambrook et al 1989.

Description de la figure 1 : Cinétiques d'activités GUS (1A) correspondant à la

construction promoteur COMTII(-1215 à +24)/GUS et COMTII (1B) au cours d'une infection virale (VMT) ou lors d'une blessure.

### **Exemple 1 : Isolement du gène COMT de classe II**

Le criblage d'une banque génomique de tabac a permis d'isoler 6 clones différents  
5 contenant des gènes de COMT de classe II (COMTII). Ces derniers ont d'abord été caractérisés par leurs profils de restriction qui ont révélé une certaine hétérogénéité parmi les différents clones.

Les COMTII forment une famille multigénique composée de six à sept gènes dont un seul est transcrit dans les réactions de défense puisqu'un seul type d'ADNc a été  
10 caractérisé dans une banque élaborée à partir de feuilles inoculées par le virus de la mosaïque du tabac (VMT) (Pellegrini & al. 1993). Afin d'identifier le ou les clones renfermant le gène exprimé lors des réactions de défense, des réactions PCR ont été réalisées en utilisant des amorces dérivées de la région 3' non codante de l'ADNc. Dans des conditions de sélectivité élevée un seul clone est alors amplifié. Les produits  
15 d'amplifications ont été séquencés. Les séquences obtenues ont présenté une homologie parfaite avec celles des régions 3' non codantes de l'ADNc.

### **Exemple 2 : Analyse des séquences du promoteur de gène de la COMT de classe II**

20 Le clone génomique retenu a été sous-cloné dans un vecteur bactérien (puc 18) et représente un insert de 14 kb dont 9 kb sont situés en amont de l'ATG du gène COMTII.

Le site d'initiation de la transcription a été déterminé par la technique d'extension d'amorce et il se place à 90 nucléotides du site d'initiation de la traduction.

Le promoteur a été séquencé sur une longueur de 1771 kilobases. Des éléments  
25 non spécifiques et communs aux gènes eucaryotes impliqués dans l'initiation de la transcription tels la TATA box et la CAT box ont été retrouvés dans le promoteur COMTII (SEQ ID NO 1). Des sites de régulation ont été mis en évidence par comparaison des séquences promotrices du gène COMTII avec celles de gènes intervenant dans les mécanismes de défense. Le promoteur COMTII contient des  
30 éléments spécifiques des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes impliqués dans la réponse au stress comme les trois boîtes P, A, L (initialement identifiées dans le gène PAL de persil) (SEQ ID NO 1). Ces trois boîtes sont impliquées dans la réponse aux

éliciteurs et les boîtes P et L sont également impliquées dans la réponse aux UV. La boîte E initialement identifiée dans le gène de la CCoAOMT de persil et extrêmement conservée dans les gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes joue aussi un rôle dans la réponse aux éliciteurs.

5 Le promoteur COMTII possède également des éléments jouant un rôle important dans l'induction de gènes PR par les éliciteurs telle la boîte W (SEQ ID NO 1).

Des éléments régulateurs généraux sont retrouvés dans le promoteur de la COMTII telles les boîtes G, GT et l'élément activateur du virus simiens SV40 (SEQ ID NO 1). La boîte G est un élément présent dans une grande variété de promoteurs  
10 végétaux. La boîte G, associée à des éléments cis spécifiques, est impliquée dans la régulation de nombreux gènes répondant à différents signaux physiologiques et environnementaux. La région promotrice, responsable de la régulation de gènes par le méthyle jasmonate, est constituée d'une boîte G associée à des séquences riches en nucléotides C. Une organisation similaire est retrouvée au niveau du promoteur de gènes  
15 spécifiquement induits lors de la blessure. Les boîtes L, présentes dans le promoteur de la COMTII, pourraient intervenir dans ce genre d'interactions car ce sont des motifs riches en nucléotides C.

Les boîtes GT, représentées plusieurs fois dans les promoteurs, semblent jouer un rôle dans la modulation de l'expression de certains gènes végétaux, soit en tant  
20 qu'activateur ou en tant que répresseur.

### **Exemple 3 : Analyse fonctionnelle des régions promotrices du gène COMTII**

L'analyse fonctionnelle du promoteur COMTII a été réalisée par transgénèse en expression stable. Le transgène a été obtenu par fusion transcriptionnelle entre le  
25 promoteur et un gène rapporteur, le gène GUS ( $\beta$ -glucuronidase). Quatre constructions correspondant à différentes délétions du promoteur ont été réalisées afin de préciser la nature des séquences promotrices importantes responsables de la régulation du gène. Ces constructions correspondent aux séquences promotrices de -1215 à +24 paires de bases (bp), de -420 à +24 bp, de -313 à +24bp et de -121 à +24 bp (par rapport au site  
30 +1 de la transcription), 557 à 1795, 1352 à 1795, 1459 à 1795 et 1651 à 1795 respectivement sur la SEQ ID NO 1 introduites en amont du gène GUS dans le vecteur pBi101 (Clontech).

Les différentes constructions ont été introduites via *Agrobacterium tumefaciens* dans le génome des plantes. Une population d'une dizaine de plants de tabac transformés a été régénérée pour chaque construction. Le niveau d'expression du transgène a été déterminé par dosage de l'activité enzymatique et par des tests histochimiques.

- 5 Parallèlement l'expression des gènes COMTII a été analysée par mesure de l'activité des enzymes correspondantes.

#### Résultats:

- L'activité GUS a été testée dans ces plantes dans différentes conditions d'induction des réactions de défense, par un éliciteur fongique injecté dans les feuilles (mégaspermine), ou après exposition aux UV. Les résultats obtenus sont rapportés dans les Tableaux 1 et 2 ci-dessous. L'activité GUS est exprimée en pmoles MU/min. mg.
- 10 Pour le Tableau 1, le témoin (T) est constitué par l'infiltration d'eau dans les feuilles des plantes transformées. Des plantes contrôles transformées avec un vecteur vide avaient une activité d'environ 10-30 pmoles/min.mg. Pour le Tableau 2, le témoin (T)
- 15 correspond à l'activité GUS basale dans les plantes non traitées.

**Tableau 1 - Expression de l'activité GUS correspondant aux différentes constructions COMT II/GUS : induction par la mégaspermine**

| Construction COMT II/GUS | Activité GUS |              |
|--------------------------|--------------|--------------|
|                          | T            | Mégaspermine |
| COMT II -1215 à +24      | 150          | 1150         |
| COMT II -420 à +24       | 2            | 6            |
| COMT II -313 à +24       | 0,4          | 0,8          |
| COMT II -121 à +24       | 0,2          | 0,8          |

**Tableau 2 - Expression de l'activité GUS correspondant aux différentes constructions COMT II/GUS : induction aux UV**

| Construction COMT II/GUS | Activité GUS |     |
|--------------------------|--------------|-----|
|                          | T            | UV  |
| COMT II -1215 à +24      | 90           | 900 |
| COMT II -420 à +24       | 10           | 12  |
| COMT II -313 à +24       | 10           | 11  |
| COMT II -121 à +24       | 11           | 10  |

Ces résultats montrent que la taille du promoteur doit être supérieure à 600pb, en l'occurrence 1239 bp pour permettre l'induction et une forte expression du gène GUS. Les délétions du promoteurs correspondant aux constructions (-420 à +24), de (-313 à +24) et de (-121 à +24) provoquent une perte complète de l'expression du gène GUS dans toutes les conditions testées. L'activité du gène GUS sous le contrôle du promoteur de 1239 pb est 1000 fois supérieure à celle observée pour les autres constructions.

Les construits suivants pour différentes tailles de promoteurs supérieures à 600 bp ont été préparés et transférés dans les tabacs pour analyse :

10 {liste des construits}

*Activation du promoteur de la COMTII par la blessure et le méthyle jasmonate et par des éliciteurs d'origine et de nature variées.*

Les plantes transgéniques possédant la construction COMTII(- 1215 à +24)/GUS ont été traitées avec différents produits chimiques, régulateurs des réactions de défense, par l'acide salicylique (SA) et le méthyl-2-6-dichloroisonicotinique (INA), par des éliciteurs fongiques comme des glucanes ou des fragments de chitine et un éliciteur d'origine végétale comme la pectine. L'activité GUS a été mesurée dans les feuilles 16h après infiltration de ces composés et les résultats rapportés dans le Tableau 3 ci-dessous. L'activité GUS est exprimée en pmole MU/min.mg. Le témoin (T) correspond à l'activité GUS basale dans les plantes transformées non traitées.

**Tableau 3 - Induction de l'activité GUS par des éliciteurs**

|                            | Activité GUS | Induction % |
|----------------------------|--------------|-------------|
| <b>T</b>                   | 600          | 100         |
| <b>H2O</b>                 | 1200         | 200         |
| <b>SA (1mM)</b>            | 1200         | 200         |
| <b>INA (1mM)</b>           | 1700         | 200         |
| <b>Chitines (100µg/ml)</b> | 1200         | 200         |
| <b>Glucanes (200µg/ml)</b> | 1400         | 200         |
| <b>Pectines (200µg/ml)</b> | 3700         | 600         |

L'augmentation la plus forte de l'activité GUS (de l'ordre de 3) est obtenue dans les plantes infiltrées par des fragments pectiques par rapport au contrôle.

L'induction du promoteur de 1239 pb a été étudiée lors de la blessure ou après traitement par le méthyle jasmonate (molécule jouant un rôle dans la signalisation des réponses de défense lors de la blessure) et par le benzothiadiazole (BTH) (inducteur chimique de la SAR). L'activité GUS est mesurée 16h après traitement. Les résultats sont rapportés sur le Tableau 4 ci-dessous.

**Tableau 4 - Induction de l'activité GUS par différents composés et stress**

|                          | Induction de l'activité GUS % |
|--------------------------|-------------------------------|
| <b>T</b>                 | 100                           |
| <b>BTH</b>               | 250                           |
| <b>Blessure</b>          | 600                           |
| <b>Méthyle jasmonate</b> | 1450                          |
| <b>UV</b>                | 1000                          |

Le témoin (T) correspond à l'activité GUS des plantes non traitées. Le promoteur est activé par les différents traitements.

Les facteurs d'induction varient de 2,5 (BTH) à 14,5 (méthyle jasmonate).

**10 Activation du promoteur de la COMTII lors de l'infection virale.**

L'inoculation du VMT chez le tabac nécessite la production de micro blessures au niveau des feuilles permettant l'entrée du virus et sa multiplication. L'activité GUS et l'activité COMTII ont été mesurées dans les feuilles blessées et dans les feuilles inoculées par le virus. Les résultats (figure 1) montrent que le gène GUS sous le contrôle du promoteur COMTII a une cinétique d'induction identique à celle du gène COMTII endogène, suivie par la mesure de l'activité catalytique des protéines correspondantes. Le promoteur COMTII est induit précocement par la blessure et présente un maximum d'activité à 16h. Le même pic d'activité est observé à 16h au cours de l'infection virale et est dû à la blessure des feuilles provoquée par l'inoculation du virus. Dans les feuilles inoculées, l'activité GUS est fortement stimulée à partir du 3ème jour et progresse jusqu'au 7ème jour. L'induction locale et systémique du promoteur lors de l'infection virale a été mesurée à 3 et 7 jours après l'inoculation du VMT. Les activités GUS exprimées en pmol MU/min.mg, sont rapportées dans le Tableau 5 et représentent une moyenne des valeurs obtenues dans 9 transformants. Le témoin T correspond à l'activité GUS des plantes non traitées.

**Tableau 5 - Induction locale et systémique (SAR) de l'activité GUS**

|   | Activité GUS |
|---|--------------|
| <b>T</b>                                | 700          |
| <b>Feuilles inoculées après 3 jours</b> | 3800         |
| <b>Feuilles inoculées après 7 jours</b> | 7100         |
| <b>Feuilles SAR après 7 jours</b>       | 2700         |

Ces résultats montrent une induction de 1100% du promoteur à 7 jours dans les  
5 feuilles inoculées. L'activité GUS mesurée à 7 jours dans les feuilles SAR est plus faible  
mais très significative. Cependant, dans les feuilles non inoculées les facteurs  
d'induction calculés à partir des activités GUS sont plus fortes que celles obtenues à  
partir des activités COMTII (Tableau 6). Ceci est dû, d'une part au fait que le test  
d'activité GUS est plus sensible que celui de la COMTII et, d'autre part au fait que la  
10 protéine GUS est extrêmement stable et que l'activité GUS mesurée correspond à une  
accumulation de cette protéine après le traitement. La comparaison des activités GUS et  
COMTII est rapportée dans le Tableau 6 ci-dessous. Les feuilles non inoculées où se  
développe la résistance systémique acquise sont appelées " feuilles SAR ".

**Tableau 6 –Facteurs d'induction des activités GUS et COMTII 3 et 7 jours**  
15 **après inoculation par le VMT dans les feuilles infectées et les feuilles SAR**

|                | Induction des activités GUS |              | Induction des activités COMTII |              |
|----------------|-----------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|
|                | Feuilles Inoculées          | Feuilles SAR | Feuilles Inoculées             | Feuilles SAR |
| <b>3 jours</b> | 5,8                         | -            | 5,8                            | -            |
| <b>7 jours</b> | 11                          | 3,9          | 15                             | 1,8          |

***Analyse histochimique de l'activité GUS lors d'une infection virale et après  
blessure.***

Une analyse histochimique de l'activité GUS dans des feuilles inoculées par le  
20 VMT, 7 jours après virose, montre que l'expression du gène GUS est localisée dans les  
cellules entourant le site d'infection. Des coupes transversales des feuilles au niveau des  
lésions ont été réalisées afin de déterminer les types cellulaires impliqués et, montrent  
que l'induction du gène GUS n'est pas tissu spécifique mais concerne toutes les cellules

autour des lésions.

L'analyse histochimique de l'expression du gène GUS dans des feuilles blessées, 2 jours après traitement, montre une induction du gène GUS dans les tissus non blessés entourant les sites de blessure par piqûres ou à l'aide de forceps. Ces résultats impliquent qu'un signal est émis à partir des tissus blessés vers les tissus intacts induisant une expression systémique du gène GUS. Le méthyle jasmonate synthétisé dans les tissus blessés pourrait induire à distance le gène GUS, car une application exogène de méthyle jasmonate induit une activité GUS. Le test histochimique réalisé sur des feuilles issues de plantes transgéniques 35S/GUS est le contrôle positif de l'expérience. Des coupes transversales de feuilles blessées montrent également que tous les types cellulaires sont induits par la blessure.

#### **Exemple 4 : Activité anti-infectieuse de COMTII/mégaspermine dans le tabac**

##### **4.1. Clonage d'un ADNc codant pour la $\beta$ mégaspermine.**

Le clonage de gènes d'élicitrine tels que ceux de la parasiticéine et de la cryptogéine ont montré que ces gènes codaient pour une préprotéine (Kamoun et al., 1993 ; Panabières et al., 1995). La séquence codante de ces élicitines comprend un peptide signal de 20 acides aminés, permettant leur excrétion dans le milieu extracellulaire suivi d'une séquence de 98 acides aminés correspondant à la protéine mature.

La séquence protéique de la  $\beta$  mégaspermine, préalablement déterminée (Kauffmann S., résultats non publiés), montre une forte homologie avec celle de la cryptogéine (Kamoun et al., 1993). Nous avons émis l'hypothèse que les séquences nucléotidiques des gènes correspondants pouvaient être très proches. Des amorces dérivées de la séquence nucléotidique du gène de la cryptogéine ont été synthétisées afin d'isoler par PCR un ADNc codant pour la  $\beta$  mégaspermine. Ces amorces se placent au niveau de la séquence codant pour le peptide signal et contiennent le codon d'initiation de la traduction. Des réactions d'amplification ont été effectuées sur les reverse transcrits de *Phytophthora megasperma* en utilisant une amorce sens dérivée de la séquence nucléotidique de la cryptogéine et l'oligodT comme amorce antisens. Un fragment amplifié d'environ 450 nucléotides a été obtenu. Ce fragment a été cloné dans un vecteur bactérien afin d'être séquencé.

L'analyse des séquences a révélé que le clone ainsi obtenu code pour une



préprotéine comprenant une séquence signal de 20 acides aminés et une séquence de 98 acides aminés correspondant à la  $\beta$  mégaspermine (SEQ ID NO 12). La séquence nucléotidique correspondant au peptide signal présente par ailleurs 100% d'identité avec celle de la cryptogéine.

- 5 L'ADNc natif de la  $\beta$  mégaspermine a été fusionné d'une part au promoteur COMT II et d'autre part au promoteur 35S. Le promoteur COMT II de 1239 pb a été utilisé car il possède tous les éléments régulateurs nécessaires à son induction.

#### 4.2. Obtention des tabacs transgéniques

- Des plants de tabac *Nicotiana tabacum* Samsun NN ont été transformés avec les  
10 deux constructions via *Agrobacterium tumefaciens*. Six transformants primaires pour chaque construction ont été régénérés et autofécondés. Les plantes issues de la seconde génération présentent un phénotype normal excepté certains individus possédant le gène de la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S. Ces plantes présentent un délai de croissance et ont également un système racinaire peu développé. Cependant  
15 aucune nécrose tissulaire rappelant celle développée par l'infiltration foliaire et pouvant être liée à l'expression de l'élécitine n'est observée dans les plantes transgéniques.

#### 4.3. Analyse de l'expression de la $\beta$ mégaspermine dans les tabacs transgéniques.

- L'expression de la  $\beta$  mégaspermine a été analysée dans les feuilles des plantes  
20 transgéniques possédant l'ADNc de l'élécitine sous le contrôle du promoteur 35S par Western-Blot (figure 2A) et par Northern-Blot (figure 2B). De façon surprenante, la  $\beta$  mégaspermine est indétectable dans tous les transformants analysés (figure 2A). Le niveau de transcription de l'élécitine a donc été examinée dans ces plantes par Northern-Blot (figure 2B). Les transcrits ont pu être détectés et le niveau d'expression varie d'un  
25 transformant à l'autre. Il apparaît que dans 2 types de plantes (E et F) la taille des transcrits est plus petite que la taille du messenger complet. Dans ce cas, l'absence de protéine pourrait être expliquée par le fait que l'ADNc est tronqué. Pour les plantes A, B, C, D la taille des transcrits correspond à celle de l'élécitine exprimée par le champignon et le taux de transcrits n'est pas négligeable, sauf pour la plante B montrant  
30 une très faible proportion de transcrits. Les plantes A qui possèdent les niveaux de transcrits les plus élevés montrent également un retard de croissance. Par la suite, seuls les transformants présentant les transcrits complets de  $\beta$  mégaspermine ont été testés

pour leur résistance.

De la même manière, l'expression de la  $\beta$  mégaspermine sous contrôle du promoteur COMT II a été analysée par Western-Blot dans les feuilles des tabacs transgéniques (figure 3). L'expression a été étudiée dans les plantes saines non traitées  
 5 pour déterminer le niveau de base d'expression de l'élécitine et après blessure pour analyser le niveau d'induction obtenu. Dans les tissus non traités, le niveau de la  $\beta$  mégaspermine est indétectable. Par contre, l'élécitine est détectée en très faible quantité dans les tissus blessés. Ceci est dû à l'activation du promoteur COMT II par la blessure. L'accumulation de la COMT II a été également examinée dans les mêmes plantes  
 10 transgéniques en utilisant des anticorps anti-COMT II. De façon surprenante la COMT II est détectée à un niveau non négligeable dans les tissus non traités, alors que normalement seule une très faible activité COMT II est détectée dans les plantes saines non transformées ou transformées avec le gène chimérique COMT II::GUS (Collendavelloo et al., 1981 ; Pellegrini et al., 1993). La COMT II est également  
 15 produite en quantité plus grande dans les tissus blessés par comparaison aux plantes contrôles blessées de la même façon.

Le promoteur COMT II permet une expression induite de l'élécitine dans les tabacs transgéniques. Ceci a été vérifié pour les 6 transformants. Cependant la quantité d'élécitine détectée dans les plantes après induction est très faible. La présence de  
 20 COMT II dans les plantes non traitées laisse supposer qu'une très faible quantité d'élécitine (non détectée par la méthode utilisée) est produite dans la plante saine et que cette synthèse est suffisante pour induire le gène COMT II endogène. De plus, il semblerait qu'une expression induite de l'élécitine lors de la blessure permette également une plus forte induction du gène COMT II endogène.

25 Par ailleurs, l'analyse de la  $\beta$  mégaspermine sur gel dénaturant montre une migration électrophorétique inférieure à celle de la  $\beta$  mégaspermine mature purifiée (figure 3). Cette différence de migration a été évaluée à 3 kD ce qui correspond à la taille du peptide signal. Ce résultat semble indiquer que le peptide signal n'a pas été clivé. Cependant il est possible que la protéine mature soit produite en plus petite  
 30 quantité par les cellules végétales et que cette quantité se situe en dessous du seuil de détection sur ce Western-Blot.

L'étude de l'expression de la  $\beta$  mégaspermine dans des tabacs transgéniques

semble indiquer qu'une expression constitutive d'élicitrine ne soit pas tolérée par les plantes et par conséquent ne permette pas son accumulation dans les cellules végétales. Seule une expression induite permet une synthèse de la  $\beta$  mégaspermine à un niveau détectable. Ces résultats pourraient être liés au caractère toxique de la protéine.

5                    **4.4. Analyse du niveau de résistance des plantes transgéniques vis à vis de différents agents pathogènes.**

***Résistance antivirale.***

a) Résistance vis à vis du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT).

Les tabacs transformés possèdent le gène de résistance N et réagissent donc par  
10 une HR lors de l'inoculation par le VMT. Dans ces expériences la résistance au virus est quantifiée par la mesure de la taille des lésions 7 jours après infection, lorsqu'elles ont atteint leur taille presque définitive. Plus la résistance développée par la plante est grande, plus les tailles des lésions sont petites, illustrant ainsi un confinement plus important du pathogène au site d'infection. Le promoteur du gène COMT II étant  
15 fortement induit autour des lésions lors de la HR au VMT, il devrait permettre une forte expression de la  $\beta$  mégaspermine au site d'infection. Pour le vérifier, les plantes transgéniques a,b,c,d,e et f exprimant l'élicitrine sous le contrôle du promoteur COMT II et les transformants A, B, C, D possédant l'ADNc de la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S ont été inoculés par le VMT. Les plantes témoins sont des plantes  
20 transgéniques pour le gène chimérique "promoteur COMT II::GUS".

Sept jours après virose, les lésions développées sur les plantes exprimant la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S ne semblent pas différentes de celles des plantes témoins. Par contre des lésions plus petites sont observées sur les plantes transgéniques exprimant la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II par  
25 rapport à celles obtenues sur les plantes témoins.

Une analyse statistique de la taille des lésions a été effectuée en mesurant le diamètre de 100 à 150 lésions chez les plantes témoins et chez les plantes transgéniques pour la  $\beta$  mégaspermine. La figure 4 représente la distribution de la taille des lésions mesurées sur les plantes témoins et pour une lignée exprimant l'élicitrine sous le contrôle  
30 du promoteur 35S (plantes A) et une lignée exprimant l'élicitrine sous le contrôle du promoteur COMT II (plantes b). Cette distribution suit une courbe de Gauss ce qui autorise l'analyse statistique des résultats. Les plantes témoins présentent une taille de

lésions dont la moyenne est de  $3,3 \pm 0,5$  mm. La moyenne de la taille des lésions obtenue pour les plantes A n'est pas significativement différente de celle des témoins ( $3,1 \pm 0,6$  mm) par contre celle obtenue pour les plantes b est fortement inférieure au témoins ( $1,4 \pm 0,6$  mm). Les résultats obtenus pour chaque lignée indépendante sont regroupés sur la figure 5 et montrent que tous les transformants (plantes A, B, C et D) possédant l'ADNc de la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S présentent une taille de lésions ne différant pas de celle des témoins. En revanche, toutes les plantes exprimant l'élécitine sous le contrôle du promoteur COMT II présentent une taille moyenne de lésions significativement inférieure à celle des plantes témoins. Cette diminution est plus ou moins importante selon les transformants. Une forte réduction, d'environ 60%, de la taille des lésions est obtenue pour les transformants COMT II::meg a, b, et f et la plus faible observée est de 36% et correspond au transformant COMT II::meg e.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que les plantes exprimant la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S présentent un niveau de résistance antiviral équivalent à celui des plantes témoins. Par contre, une résistance accrue au VMT est obtenue pour les tabacs transgéniques exprimant la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II. Cependant tous les lignées transgéniques ne présentent pas le même niveau de résistance. Ceci pourrait être lié à des niveaux d'expression différents de la  $\beta$  mégaspermine dans ces différentes plantes transgéniques.

#### b) Résistance au Virus de la Mosaïque de la Luzerne (VML).

Nous avons testé la résistance des tabacs transgéniques COMT II::mégaspermine vis à vis d'un autre virus, le VML, qui infecte le tabac de façon systémique. Une dizaine de jours après virose, le VML s'est propagé dans toute la plante et produit au niveau des feuilles non inoculées des symptômes de mosaïque.

Les plantes exprimant la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II choisies pour ce test correspondent à la lignée b qui présente un niveau de résistance élevé au VMT. Les plantes A possédant l'ADNc de la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S ont été également inoculées ainsi que des plantes témoins COMT II::GUS. Pour chaque lignée transgénique, 5 plantes ont été inoculées. Nous avons examiné le phénotype des différentes plantes quinze jours après traitement. A ce stade les symptômes de mosaïque sont bien développés sur les plantes COMT II::GUS. Les

plantes transgéniques A montrent une mosaïque similaire aux plantes témoins. Par contre, une réduction de ces symptômes est observée dans les plantes transgéniques b.

La charge virale a été examinée dans les feuilles systémiques de même niveau (3<sup>ème</sup> feuille au dessus de la feuille inoculée). Cette analyse a été effectuée par Western-  
 5 Blot en utilisant des anticorps dirigés contre la coque protéique du virus (figure 6). La quantité de virus présente dans les différentes plantes transgéniques est évaluée par rapport à la quantité de virus présente dans les plantes témoins. Les résultats obtenus montrent que les plantes exprimant la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S ont de 10 à 15 fois moins de virus que les plantes témoins. Cette réduction de la  
 10 quantité de virus peut paraître importante. Il faut savoir cependant que les quantités de virus produites dans les plantes sauvages peuvent varier dans les mêmes proportions. Par contre les plantes transgéniques exprimant la mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II contiennent 1000 à 10000 fois moins de virus que les plantes témoins. Ceci représente une réduction considérable et très significative de la charge  
 15 virale.

Ces résultats suggèrent que seules les plantes transformées avec la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur inductible COMT II sont moins sensibles vis à vis d'une infection systémique virale. Ceci montre également une corrélation entre la réduction des symptômes d'infection et la diminution de la charge virale dans ces  
 20 feuilles.

### *Résistance antifongique.*

Nous avons examiné si la production d'élicitines *in planta* conférait une résistance induite vis à vis d'un champignon du sol, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Ce champignon infecte les plants de tabac par les racines envahissant le système racinaire  
 25 puis vasculaire provoquant ainsi une sclérose des vaisseaux conducteurs. Les symptômes d'infection se traduisent par une pourriture noire au niveau du collet. Ce mode d'infection est difficile à mettre en oeuvre car il nécessite une concentration en zoospores adéquate et répond à des conditions strictes de température et d'humidité. Un mode "artificiel" d'inoculation consiste à appliquer après décapitation des tabacs le  
 30 mycélium du champignon au niveau de la tige sectionnée. Après 7 jours les tiges sont prélevées et les symptômes d'infection sont examinés à l'intérieur des tiges.

L'inoculation a été effectuée sur 7 plantes témoins COMT II::GUS. Pour chaque

lignée transgénique pour la  $\beta$  mégaspermine, cinq plantes ont été inoculées. Les plantes A, B, C et D possédant la construction "promoteur 35S-mégaspermine" ont été testées. Pour les plantes possédant le gène de la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II, les lignées a et b présentant une forte résistance accrue au VMT ont été choisies ainsi que la lignée e présentant un niveau plus faible de résistance.

La progression des symptômes mesurée dans les tiges des plantes témoins atteint une longueur moyenne de 5,3 cm. Un ralentissement des symptômes d'infection est observé dans les tiges des plantes transgéniques exprimant la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S. Cette diminution est variable d'un génotype à l'autre (figure 7). La progression du champignon est fortement ralentie dans les plantes 35S::meg A ( $d=0,8\text{cm}$ ) et plus faiblement dans les plantes 35S::meg B ( $d=3,8\text{cm}$ ) par rapport au plantes témoins ( $d=5,3\text{cm}$ ). Les plantes A correspondent aux plantes qui présentent la plus forte proportion de transcrits de  $\beta$  mégaspermine, alors que les plantes B ont un taux très faible de transcrits codant pour l'élécitine. Ceci pourrait suggérer une corrélation entre les niveaux de transcrits d'élécitine détectés (et sans doute les niveaux de  $\beta$  mégaspermine produits même si ceux ci restent sous le seuil de détection) et le niveau de résistance antifongique induit.

La progression du champignon est également fortement ralentie dans les tiges des plantes transgéniques exprimant la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II. Nous avons montré par ailleurs que le promoteur COMT II était induit lors de l'infection par *P. parasitica*. Les tiges des transformants COMT II::meg a, b et e sont respectivement infectées sur une longueur de 0,7 cm, 1 cm et de 3,5 cm. Les plantes a et b sont les plus résistantes à l'infection par *P. nicotianae* et correspondent également aux plantes présentant la plus forte résistance au VMT. Ainsi, il apparaît que les mêmes niveaux de résistance relatifs sont détectés avec les deux agents pathogènes testés. Nous pouvons supposer que les niveaux de résistance induits dans ces plantes sont liés au taux d'expression de l'élécitine. Une analyse des niveaux de transcrits par Northern-Blot permettrait peut être de confirmer cette hypothèse, sachant la difficulté de détecter la protéine par Western-Blot.

Ces résultats montrent que l'expression constitutive ou induite de  $\beta$  mégaspermine dans des tabacs transgéniques permet de conférer un niveau de résistance accru vis à vis de d'une infection fongique.

### *Résistance antibactérienne*

Nous avons également testé la résistance des plantes transgéniques exprimant la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II vis à vis d'une bactérie, *Erwinia carotovora*. Cette bactérie est un agent pathogène bien connu de la pomme de terre et est capable de macérer les tissus végétaux par la synthèse d'enzymes pectinolytiques. Cependant elle peut également infecter d'autres plantes tel le tabac.

Pour ce test, une suspension d'*E. carotovora* a été infiltrée dans les feuilles des plantes transgéniques COMT II::mégaspermine ainsi que dans les feuilles des plantes contrôles (correspondant aux plantes transgéniques pour le gène chimérique COMT II::GUS). Une population de 7 plantes a été inoculée pour chacun des transformants. Deux jours après inoculation des bactéries, 60% des plantes contrôles (4 plantes sur 7) présentent des symptômes d'infection sévères, les feuilles inoculées sont entièrement macérées et l'infection tend à se propager au niveau de la plante entière. A l'inverse 85% des plantes transgéniques exprimant la  $\beta$  mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMTII (6 plantes sur 7) sont résistantes à l'infection bactérienne.

Ces résultats montrent que l'expression induite de l'élécitine accroît fortement la résistance vis à vis d'*E. carotovora*. Nous avons précédemment montré que le promoteur COMT II était inductible par des éliciteurs secondaires parmi lesquels les fragments pectiques. Ainsi nous pouvons supposer que les fragments pectiques produits lors de la lyse des tissus végétaux induisent le promoteur COMT II et par conséquent la synthèse de  $\beta$  mégaspermine. Cependant le mécanisme permettant la mise en place de la résistance antibactérienne reste encore à déterminer.

### Matériel et méthodes

**Criblage d'une banque génomique et identification du clone correspondant au gène exprimé pendant la réponse de défense.**

Une banque d'ADN génomique de tabac (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) construite dans  $\lambda$ -EMBL3 (Clontech) a été criblée avec une sonde radioactive d'ADNc de COMT II (Pellegrini & al., 1993). Six clones génomiques positifs ont été isolés après quatre tours de purification. Ces clones purifiés ont été testés par PCR pour identifier celui qui comprend le gène COMT exprimé pendant la réponse d'hypersensibilité (HR) des feuilles de tabac au VMT. Les amorces 5' et 3' pour l'analyse PCR sont représentés

par les oligonucléotides 1 et 2 ci-dessous (SEQ ID NO 4 et SEQ ID NO 5 respectivement) :

Oligo 1 : 5' CGTTTCGCAA TGTGATTGA TC 3'

Oligo 2 : 5' CTCAAAATGA CATCCTTTCA TAC 3'

5 Ils sont dérivés de la région non traduite en 3' de l'ADNc de COMT II. L'analyse PCR est effectuée à 62 °C (température de fusion théorique) de manière à promouvoir une hybridation spécifique. Un seul clone permet l'amplification du fragment attendu de 400 paires de bases comme le fait l'ADNc employé comme contrôle positif. Le clone génomique de COMT II a été purifié sur Quiagen tip selon le protocole décrit par le  
10 fabriquant et sous cloné dans le site de restriction *Sall* du vecteur plasmide puc 18.

#### **Séquençage de l'ADN.**

Le séquençage de l'ADN a été effectué sur l'ADN double brin dénaturé selon la méthode de Sanger & al. (1977) en employant le kit " rhodamin dye terminator cycle ready " avec l'ADN polymérase FS ampliPac (Perkin-Elmer, P/N402078) et un  
15 séquenceur Applied Biosystems 373 (Perkin-Elmer). La séquence a été déterminée sur les deux brins avec des recouvrements en employant des amorces synthétisées à partir de séquences déjà déterminées.

#### **Analyse des produits d'extension d'amorces.**

La réaction d'extension des amorces a été effectuée sur l'ARN total selon la  
20 méthode décrite dans Current Protocols in Molecular Biology (Trienzenberg, 1992). L'ARN total isolé de feuilles de tabacs infectées par le VMT et de feuilles de tabacs non infectées (comme contrôle négatif) a été hybridé à l'oligonucléotide suivant (SEQ ID NO 6), complémentaire de l'ARNm du COMT II et marqué à l'extrémité 5' :

Oligo 3 : 5' CTGAAGATGT CAATAGTTGC ATGGC 3'

25 Le produit de l'extension a été séparé sur un gel de polyacrylamide à 6 %. La localisation du site d'initiation de la transcription a été déterminée sur la base de la comigration des produits d'extension avec l'échelle de séquence de la obtenue à partir de la région correspondante du gène (Sanger & al., 1977).

#### **Construction des plasmides.**

30 Les versions tronquées du promoteur COMTII ont été amplifiées par PCR en employant les amorces PAS1 en 3' et PS1, PS2, PS3 et PS4 en 5' représentés ci-après (SEQ ID NO 7 à 11 respectivement), conduisant respectivement à l'amplification des



fragments nucléotidiques de longueurs suivantes : -1215/+24, (nouveaux construits supérieurs à 600 bp) -420/+24, -313/+24 et -121/+24 (numérotation relative au site d'initiation de la transcription).

5 PAS1 : 5' GGTCTAGAGG GCCTTTTAGA GTGTTTTTGT TAG 3'  
 PS1 : 5' AAAGTCGACC GTCCACCTGT GCCAACAAT 3'  
 PS2 : 5' TGTTTGGTGT TATGCTTCCG TCCT 3'  
 PS3 : 5' AAAAAGCTTT TTTAGGATGG AGTACAGCC 3'  
 PS4 : 5' TTTAAGCTTA AAGAGAACCA GACAATATT 3'

10 Les construits -1728/+24, -1471/+24, -956/+24, -937/+24, -882/+24, -746/+24, -676/+24, -560/+24, -435/+24, ont été obtenus avec les amorces PAS2 en 3' et respectivement les amorces PS5, PS6, PS7, PS8, PS9, PS10, PS11, PS12 et PS13 en 5' présentées ci après (SEQ ID NO 15 à 24 respectivement):

15 PAS2: 5' CGCGGATCCC CTTTATAGAGT GTTTTTGTGA GGC 3'  
 PS5 : 5' ACGCGTCGAC GTTAGGGACA ATCTATAGTG TCAC 3'  
 PS6 : 5' ACGCGTCGAC GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGG 3'  
 PS7 : 5' ACGCGTCGAC GCTGGTTAGG TGAAGTAAAG CATG 3'  
 PS8 : 5' ACGCGTCGAC GCATGTTATA TGAGGAAAGT ACG 3'  
 PS9 : 5' ACGCGTCGAC GCAGCCAGCA CAAGCAAATT CGC 3'  
 PS10: 5' ACGCGTCGAC GACTTTAACA CACCAACTCC C 3'  
 20 PS11: 5' ACGCGTCGAC CGGATCTAGA ATTTGGGTTC ATTC 3'  
 PS12: 5' ACGCGTCGAC GTGTATACTC CACGTCTCCG GATAC 3'  
 PS13: 5' ACGCGTCGAC GTTCAATGTT AGGTGTGTTT GG 3'

25 La séquence -1073/-435 qui a été placée en amont du promoteur 35S minimum a été obtenue en utilisant l'amorce PAS3 en 3' et l'amorce PS14 en 5' (SEQ ID NO 25 et 26):

PAS3 : 5' CGCGGATCCG CTTAACACCA AACACACCTA ACATTG 3'  
 PS14 : 5' ACGCGTCGAC CAGTGGTGAG TTTAGCTGTC 3'

30 L'amplification a été effectuée pendant 30 cycles avec une étape initiale de 4 min à 95°C et une étape finale de 5 min à 72°C, en utilisant le clone génomique comme matrice. Chaque cycle consiste en 1 min à 95°C suivie d'1 min d'hybridation puis de 1,5-2 min à 72°C. L'étape d'hybridation est réalisée à 54°C, 59°C, 55°C, et 50°C pour amplifier, respectivement, les fragments -1215/+24, -420/+24, -313/+24 et -121/+24. Pour tous les autres fragments du promoteur, la température d'hybridation est de 60°C. Après sous-clonage dans le plasmide pGEM-T (Promega) et amplification dans E.

Coli, le fragment de promoteur -1215/+24 est digéré par *Sall* et *XbaI*, les sites correspondants étant présents dans les amorces PS1 et PSA1 respectivement. Les fragments de promoteur de 420, 313 et 121 paires de bases sont digérés avec *HindIII* et *XbaI* (le site pour *HindIII* est présent dans les amorces PS2, PS3 et PS4, et le site *XbaI* dans l'amorce PAS1). Les fragments -1768/+24, -1471/+24, -956/+24, -937/+24, -882/+24, -746/+24, -676/+24, -560/+24 et -435/+24 sont digérés par *BamHI* présent dans PAS2 et PAS3 et par *Sall* présent dans les amorces PS5 à PS14. Tous les fragments sont clonés dans le plasmide pBI101 (Qiagen) de façon à créer une fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur GUS. Tous les construits sont séquencés pour confirmer leur structure et les frontières de jonction.

Le construit constitué du promoteur 35S du CaMV en amont du gène de la mégaspermine a été obtenu en remplaçant le gène Gus par le gène de la mégaspermine (SEQ ID NO 12) dans le plasmide pBi121(Clontech).

#### Clonage de l'ADNc de *Phytophthora megasperma*

10 mg d'ARN totaux de *Phytophthora megasperma* sont utilisés comme matrice pour la synthèse du premier brin. Les ARN totaux sont chauffés 3 min à 65°C, refroidis sur glace, et incubés 2 h à 42°C dans 50 ml de tampon de transcription inverse (50 mM Tris-HCL pH 8,3 - 15 mM MgCl<sub>2</sub> - 75 mM KCL - 1 mM DTT) contenant 1 mM de chaque dNTP, 40 pmol d'amorce anti-sens correspondant à l'oligodT, et 20 U de transcriptase inverse d'AMV (virus de la myéloblastose aviaire). Le mélange est chauffé à 94°C pour stopper la réaction. Après précipitation du mélange réactionnel à l'éthanol, le culot est dissous dans de l'eau stérile distillée.

La synthèse du second brin est initiée par la Taq ADN polymérase. 1/20 du produit de transcription inverse est utilisé pour l'amplification par PCR dans 50 ml de tampon (10 mM Tris-HCL pH 8,3 - 50 mM KCL - 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> - 0,01% BSA), 200 mM de dNTP, 0,1 mM d'amorces sens et anti-sens et 1 unité de Taq. L'amorce sens (5' ATGAAGTTCACCGCTCTGCT 3') dérive de la séquence nucléotidique de la cryptogéine, l'amorce anti-sens correspond à l'oligodT possédant les sites de restriction *SstI*-*EcoRI*-*HindIII* à son extrémité 5'. Le mélange réactionnel est chauffé pendant 3 min à 94°C, puis est soumis à 30 cycles de réaction comprenant chacun 3 étapes : 1 min à 94°C, 1 min à 49°C et 1 min à 72°C. Après le dernier cycle, l'élongation est

poursuivie 10 min à 72°C. Le produit d'amplification obtenu est ensuite cloné dans le vecteur pGEM (Promega) afin d'être séquencé.

### Transformation des plantes

Les différents construits promoteur COMTII-GUS obtenus précédemment dans le plasmide pBI101 sont introduits dans une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pPM6000) (Rossi & al., 1993) par électroporation (Nagel & al., 1990). Les plants de tabac (*Nicotiana tabacum* cv Samsun NN) sont transformés par infiltration d'*Agrobacterium* sur des plants de 10 jours (Rossi & al., 1993). Les plantes sont régénérées sur un milieu Murashige & Skoog (MS) (GIBCO BRL) supplémenté avec du saccharose (30 g/l pour la formation des tiges et 15 g/l pour la formation des racines), de la 6-benzylaminopurine (Serva) (2 mg/ml), et de l'acide naphthalène acétique (Serva) (0,05 mg/ml). La kanamycine (150 mg/ml) est employée comme agent de sélection durant les étapes de régénération *in vitro* et de propagation. Des plantes contrôles ont été préparées par transformation avec le vecteur vide pBI101. Sept à 10 transformants indépendants sont régénérés pour chaque construit. Les transformants primaires sont auto fécondés et les graines F1 sont germées sur un milieu MS comprenant 300 mg/l de kanamycine.

### Essais enzymatiques

La localisation histochimique du GUS dans les plantes transgéniques est effectuée selon la méthode décrite par Jefferson & al. (1987). La réaction histochimique est incubée dans l'obscurité à 37°C pendant 12 heures. Les tissus sont rincés, d'abord avec un tampon phosphate 50 mM pour terminer la réaction, puis plusieurs fois avec de l'éthanol de 70% à 90% pour éliminer la pigmentation des tissus. Après la réaction histochimique, les tissus sont rincés dans l'éthanol à 70% et sont inclus dans une historésine de fixation (Jung) pour des sections transversales de feuilles. Les blocs d'historésines sont coupés avec un microtome et des photographies sont prises à un grossissement de 10 à 40 fois par un microscope binoculaire.

Le dosage des activités COMTII et GUS a été effectué sur 100mg de tissus. Le tissu est homogénéisé dans un tampon phosphate de sodium 100mM à pH 7,5 et 10 mM de DTT après addition de polyclar AT (Serva) et de quartz. Les extraits bruts sont clarifiés par centrifugation et par filtration sur de la laine de verre. La mesure des activités GUS et COMTII est effectuée sur les même extraits bruts. Pour la mesure de

l'activité COMTII, un aliquote de l'extrait protéique est ajouté à 1 ml de tampon phosphate comprenant 100µM de catéchol, 50µM de S-adenosyl-L-méthionine tritiée ( $1,5 \cdot 10^5$  cpm/ml) et incubé pendant 3 heures à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 100µl d'acide sulfurique 9M. Le produit radioactif de la réaction, l'acide ferulique, est extrait par 5 ml d'une solution NA de scintillation (Beckman) et la radioactivité est comptée sur un appareil Beckman LS 9000. La mesure fluorimétrique de l'activité GUS est effectuée sur les mêmes échantillons selon la procédure de Jefferson & al. (1987). Le contenu protéique est déterminé par la méthode de Bradford (1976) en employant les réactifs Biorad.

#### 10      **Construits COMTII-meg et 35S-meg**

Le vecteur pGEM (Promega) ne possédant pas les sites de clonage compatibles ceux du pBi101, une étape de sous clonage dans le vecteur Bluescript (pSK) a été nécessaire. L'insert BamHI/SstI provenant du pSK::mégaspermine a été purifié pour le clonage dans le vecteur binaire pBi101 (Clontech).

15      Le vecteur pBi101::COMT II-GUS précédemment construit et correspondant au promoteur -1215/+24 fusionné au gène rapporteur GUS a été utilisé pour obtenir le gène chimérique *comt II-meg*. Le gène GUS est excisé par digestion du plasmide binaire par BamHI et SstI. Un site SnaBI présent dans le gène GUS permet de couper celui-ci et évite qu'il se religue avec le plasmide binaire puisque aucune étape de purification du vecteur n'est effectuée. Les enzymes de restriction sont inactivées par la chaleur. L'ADN digéré est extrait par un mélange phénol : chloroforme (1 : 1), puis chloroforme : alcool isoamilique (24 : 1) et précipité à l'éthanol. L'ADN digéré est remis en suspension dans de l'eau stérile et ligué avec l'insert.

25      Le vecteur pBi121 (Clontech) portant le gène 35S-GUS a été utilisé pour obtenir le gène chimérique 35S-meg. Le clonage est effectué selon la méthode décrite précédemment.

Les constructions ont été ensuite vérifiées par séquençage.

#### **Plants de tabac.**

30      Les plants de tabac transgéniques (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) sont cultivés in vitro sous un cycle de lumière de 12h(24°C)/12(20°C) pendant 5 semaines après la germination. Ils sont propagés sur un milieu MS avec addition de kanamycine (150 mg/l) comme agent de sélection. Ils sont ensuite transférés en serre et cultivés en

sol sous un cycle de lumière 16h/8h à 22°+2°C.

## Analyse des ARN de plantes par Northern

### *Extraction des ARN totaux*

5 Les tissus sont finement broyés dans de l'azote liquide, puis dans 1 à 2 volumes de tampon d'extraction (0,2 M borate de sodium pH 9 - 30 mM EGTA - SDS 1% - 5 mM DTT). Le mélange est versé dans un tube contenant 1 volume de phénol/chloroforme (1:1), vortexé, puis centrifugé 10 min à 5000g. Une deuxième extraction au phénol/chloroforme (1:1) est réalisée, suivie d'une troisième au  
10 chloroforme/alcool isoamylique (24:1). Les ARN présents dans le surnageant sont spécifiquement précipités par addition de 1 volume d'une solution de LiCl (4 M) EDTA (10 mM) pendant une nuit à 0°C. Le tout est centrifugé 30 min à 10000g et le culot est lavé avec une solution de LiCl (2 M), EDTA (5 mM). Les ARN totaux sont repris dans de l'eau et à nouveau précipités à l'éthanol 70%, NaCl (0,2 mM). Après centrifugation  
15 30 min à 10000 g, le culot est lavé deux fois à l'éthanol 70%, puis repris dans 50 µl d'eau. Les ARN sont dosés en mesurant l'absorbance d'une solution diluée à 260 (1 unité DO<sub>260</sub> = 40 µg/ml d'ARN), et leur intégrité est vérifiée par migration sur un gel d'agarose non dénaturant coloré au BET.

### *Electrophorèse*

20 Les ARN sont séparés sur gel d'agarose dénaturant préparé dans un tampon MOPS x1 contenant 16% de formaldéhyde. Des gels de 1,2% d'agarose (p/v) ont été utilisés. Les échantillons d'ARN sont dénaturés 15 min à 65°C en présence de 3 volumes de solution de dénaturation (MOPS x5 10µl, formamide 50µl, formaldéhyde 16µl) par volume d'ARN, et refroidis rapidement dans la glace. Du tampon de charge est  
25 ajouté (MOPSx1, glycérol 50 % , bleu de bromophénol 0,05 %) à raison de 1/10 du volume. Après migration dans du tampon MOPS x1, le gel peut être coloré au BET (0,5 µg/ml) 1 à 2 min, puis abondamment lavé à l'eau stérile. Les ARN sont alors visualisés sous lumière UV.

### *"Northern Blot"*

30 La technique du "Northern-blot" permet de détecter, parmi les ARN totaux, les messagers homologues à une sonde d'ADN radioactive. Celle ci est réalisée à l'aide du kit de "Random Priming" (Amersham) en suivant le protocole fourni.

10 µg d'ARN totaux de tige ou de feuille sont déposés sur gel d'agarose 1,2% (p/v) dénaturant ainsi qu'un marqueur de taille d'ARN (Promega) déposé en bordure du gel. Après migration, le gel est rincé à l'eau stérile afin d'enlever l'excès de formaldéhyde. La bande de migration correspondant au marqueur de taille est découpée, colorée au BET et photographiée.

Les ARN sont transférés par capillarité pendant 5 h sur une membrane de Nylon positivement chargée (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) avec du tampon SSC x20. Après transfert la membrane est rincée dans le tampon SSC x2 et les ARN sont fixés de façon covalente sur la membrane de nylon par exposition à la lumière ultraviolette (1200 J, UV Stratalinker 2400, Stratagene). La membrane est hybridée à une sonde radioactive et traitée comme décrit dans Sambrook et al..

### **Analyse des protéines de plantes par Western**

#### ***Extraction des protéines foliaires***

15 L'extraction peut se faire immédiatement après la récolte ou sur des échantillons congelés. 150 g de tissus foliaires sont broyés au mortier dans du tampon acétate de sodium 0.5 M pH 5.2 contenant du 2-β-mercaptoéthanol (15 mM) et du charbon actif. Le volume de tampon est ajusté de manière à obtenir un broyât fin et homogène. Celui-ci est ensuite filtré sur gaze puis centrifugé pendant 30 min à 15 000 g. Le surnageant  
20 constituant l'extrait brut est alors analysé.

#### ***Dosage des protéines***

La concentration protéique des extraits bruts est dosée par la méthode de Bradford (1976) dans des plaques de microtitration : à 10 µl d'un extrait à tester sont ajoutés 200 µl de réactif de Bradford x1 (Biorad). 2 µl d'extrait brut de feuille sont  
25 complétés à 10 µl par du tampon. Chaque échantillon est testé trois fois. Après 5 à 10 min, la plaque est lue au spectrophotomètre MR 700 (Dynatech) avec le filtre 5 (660 nm). Le blanc est constitué de 10 µl de tampon et les valeurs sont comparées à une gamme étalon réalisée avec de la sérum-albumine bovine (SAB, Sigma).

#### ***Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant***

30 L'analyse sur gel permet de déterminer la masse moléculaire des protéines en comparant leur mobilité relative à celles de protéines de masse moléculaire connue. A l'extrait protéique est ajouté 20% (v/v) de tampon de charge (60 mM Tris-HCl pH 6.8,

5% (v/v) 2-β-mercaptoéthanol, 10% (v/v) glycérol, 0.01% (v/v) bleu de bromophénol, 1% SDS). Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 1 min avant d'être déposés. Les gels (0.75 mm x 7 cm x 9 cm) sont coulés entre une plaque de verre et une plaque d'alumine. Le tampon d'électrophorèse est composé de 192 mM glycine, 25 mM Tris et 0.1% SDS. La migration verticale est réalisée dans une cuve d'électrophorèse Hoeffner à une intensité de 20 mA par gel pour une tension de 100 à 160 V.

#### **Transfert et immunodétection des protéines sur nitrocellulose (Western-Blot)**

Après migration électrophorétique sur gel d'acrylamide, les protéines peuvent être transférées, en milieu liquide dans le tampon de transfert (0,16 M Tris - 1,20 M glycine), sur membrane de type nitrocellulose ou nylon PVDF (Immobilon, Millipore). Avant le transfert le gel est équilibré dans le tampon de transfert. La membrane PVDF est activée 1 min dans le méthanol puis équilibrée également dans le tampon de transfert. L'électrotransfert s'effectue pendant 90 min à 150 mA.

L'immunodétection a été réalisée grâce à des anticorps spécifiques dirigés contre la mégaspermine ou la protéine de coque du VML. La révélation est effectuée par chimioluminescence avec le kit ECL (Amersham).

#### **Traitement des plantes.**

Avant le traitement, les plantes sont conditionnées quelques jours dans une logette climatisée à 22°C ± 1°C, sous une luminosité de 5000 lux et une photopériode J/N de 16h/8h. Ces conditions sont maintenues durant l'infection, à l'exception de l'infection par *Erwinia carotovora*.

#### **Inoculation du virus de la mosaïque du tabac (VMT)**

Les feuilles de plants de tabac, âgés de 6 semaines, sont frottées à l'aide d'un coton préalablement imbibé dans une suspension de VMT purifié (souche commune U1 0,1 à 1 µg/ml) contenant un abrasif, la célite (10 mg/ml). Après quelques minutes de contact, les feuilles sont rincées à l'eau pour enlever l'excès de célite et de particules virales.

#### **Inoculation du virus de la mosaïque de la luzerne (VML)**

Les feuilles de plants de tabac, âgés de 6 semaines, sont frottées à l'aide d'une spatule en verre trempée dans une solution tampon contenant l'ARN viral (1 à 5 µg/ml) et un abrasif, la célite (10 mg/ml). L'inoculum par feuille (pour une plante) correspond à

200 ml de solution tampon : Kpi , pH 7,2, 0,04M, 1 ml RNAsine, DTT 1mM final, Macaloïd (0,05%), ARN total de levure 0,25 mg/ml, ARN viral (1 à 5 µg/ml)

#### **Inoculation de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae***

Le mycélium de *P. p. nicotianae* est cultivé sur boîte de Pétri contenant un milieu solide (milieu avoine : 100 g de graines d'avoine broyées sont mises en suspension dans 1 l d'eau distillée. Le milieu est filtré sur gaze. Le milieu est autoclavé après addition de 15 g d'agar).

L'inoculation a été effectuée après décapitation des plants de tabac. La tige de plants de tabac âgés de 10 semaines est sectionnée sous le bourgeon apical. Une pastille de mycélium de *P. p. nicotianae* est prélevée en périphérie d'une culture de 7 jours sur milieu d'avoine et est déposée sur la section de la tige. La tige mise en contact avec la pastille de mycélium est en capsulée dans une feuille d'aluminium afin d'éviter une dessiccation trop rapide des tissus au site d'inoculation.

#### **Inoculation d'*Erwinia carotovora***

La souche d'*Erwinia carotovora* est mise en culture toute une nuit à 28°C dans du milieu LB. Après centrifugation, le culot bactérien est repris dans une solution de MgSO<sub>4</sub> (10mM) pour obtenir une concentration bactérienne approximative de  $1.10^7$  cfu (colony-forming units)/ml. Les feuilles de plants de tabac âgés de 4 à 5 semaines sont infiltrées par cette suspension bactérienne. Un seul site est inoculé par feuille, en infiltrant à l'aide d'une pipette-man 50 µl de la suspension bactérienne. Les plantes sont placées ensuite en logettes en condition d'humidité élevée et à une température de 26°C ± 1°C pendant l'infection.

**Traitement par un éliciteur :** Des solutions sont infiltrées par une seringue équipée d'une aiguille fine dans le mésophyle des feuilles. Les zones infiltrées sont délimitées avec un marqueur "felt-tip". Les zones infiltrées sont récoltées 16 heures après le traitement. Les feuilles sont traitées avec une solution de b-mégaspermine, un éliciteur protéique purifié d'un milieu de culture de *Phytophthora megasperma* (Kauffmann & al., 1993), ou d'oligosaccharides comme les oligomères de chitine (100 mg/ml), des fragments de glucane (200 mg/ml), et des fragments pectiques (200 mg/ml). Les plantes témoins sont infiltrées avec de l'eau.

**Blessure :** Des feuilles totalement développées sont blessées avec un hémostat ou percées avec des aiguilles. Les feuilles blessées sont ensuite récoltées 16 ou 24 heures



après blessure pour les analyses fluorimétriques ou histochimiques.

**Traitement UV :** La partie supérieure de plantes transgéniques âgées de 5 semaines est exposée aux rayons UV ( $\lambda=254\text{nm}$ ) pendant 10 minutes puis les plantes sont placées dans l'obscurité jusqu'à la collecte des tissus 16 heures suivant le traitement.

**Traitements chimiques :** (1) Des solutions de SA (1mM) ou de INA (50mM) sont infiltrées dans les feuilles de tabac en employant le protocole décrit pour le traitement par des éliciteurs. (2) Sous des conditions de culture identiques, on pulvérise sur les plantes transgéniques des solutions de SA (10mM), INA (1mM) ou BTH (50mM). Les tissus sont recueillis 16 heures après traitement. Les plantes traitées avec de l'eau sont utilisées comme témoin. (3) Des plantes âgées de sept semaines sont transférées dans des boîtes transparentes et hermétiques et soumises à une atmosphère de 3,5mM de MeJa (Serva). Les tissus sont prélevés à différents temps suivant le traitement. Les plantes témoins sont placées dans les mêmes boîtes sans MeJa.

#### Références :

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1998) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Bradford M.M. (1976). *A rapide and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Collendavelloo J, Legrand M, Geoffroy P, Barthelemy J & Fritig B (1981). *Purification and properties of the three o-diphenol O-methyltransferases of tobacco leaves*. Phytochemistry 20, 611-616.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (1987). *GUS fusions :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. EMBO J. 6, 3901-3907.
- Kamoun S, Young M, Glascock CB & Tyler BM (1993). *A gene encoding a host-specific elicitor protein of Phytophthora: host specificity and induction of resistance to bacterial and fungal pathogens*. Mol. Plant Microbe Interact. 6, 15-25.
- Kauffmann S., Baillieul F., Genetet I., Kopp M. & Fritig B. (1993). *Two proteins secreted by Phytophthora megasperma elicit and defense-related responses in tobacco*. In Mechanisms of plant defense responses, B. Fritig and M. Legrand, Dordrecht :

Kluwer Academic Publishers, 140-143.

Nagel R., Elliott A., Masel A., Birch R.G. & Manners J.M. (1990). *Electroporation of binary Ti plasmid vector into Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium rhizogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 67, 325-328.

- 5 Panabières F, Marais A, Berre JYL, Penot I, Fournier D & Ricci P (1995).

*Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes for elicitors, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco*. Mol. Plant Microbe Interact. 8, 1995.

- 10 Pellegrini L., Geoffroy P., Fritig B. & Legrand M. (1993). *Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O-methyltransferases induced in tobacco (Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment*. Plant Physiol. 103, 509-517.

Rossi L., Escudero J., Hohn B. & Tinland B. (1993). *Efficient and sensitive assay for T-DNA dependant transient gene expression*. Plant Mol. Biol. Rep. 12, 220-229.

- 15 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sänger F., Nicklens S. & Coulson A.R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467.

Trienzenberg S.J. (1992). *Primer extension*. In Current Protocols in Molecular Biology.

- 20 J. Wiley & Sons eds. 20.4.8.1

### Revendications

1. Fragment d'acide nucléique comprenant un promoteur de plante inductible, caractérisé en ce que ledit promoteur inductible est constitué par le promoteur d'un gène d'*O*-méthyltransférase de classe II (COMT II) de plante.
- 5        2. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un promoteur de COMT II de plante.
3. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le promoteur est activé par les blessures, les infections virales, les agressions aux rayons UV, les agressions chimiques, ou les agressions par pathogène,  
10 un insecte ou un nématode
4. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la COMTII de plante est une COMT de plante qui n'est pas exprimée dans les plantes saines non traitées, mais qui est exprimée à la suite d'une agression mécanique, chimique, ou par un pathogène, un insecte ou un nématode.
- 15        5. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la plante est une plante monocotylédone ou dicotylédone, en particulier choisie parmi le riz, le blé, l'orge, le tournesol, le maïs, le tabac, le colza, le soja ou *Arabidopsis thaliana*.
6. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce  
20 que la plante est une plante dicotylédone, de préférence le tabac.
7. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le promoteur comprend une séquence en 5' du site d'initiation de la traduction ou codon " start " (ATG) de la séquence codante de la COMTII permettant la transcription et l'expression de ladite séquence codante.
- 25        8. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1 à 7, caractérisé en ce que le promoteur comprend une séquence de plus de 600 nucléotides en amont de l'ATG de la COMTII, de préférence de plus de 1000 nucléotides en amont de l'ATG, plus préférentiellement de plus de 1200 nucléotides en amont de l'ATG.
9. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 8,  
30 caractérisé en ce que le promoteur comprend un site d'initiation de la transcription situé à moins de 100 nucléotides en amont de l'ATG, avantageusement à environ 90 nucléotides en amont.

10. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'extrémité 3' du promoteur est située entre le site d'initiation de la transcription et l'ATG.

11. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'extrémité 3' du promoteur est située entre 10 et 50 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription, plus préférentiellement entre 20 et 40 nucléotides en aval, encore plus préférentiellement entre 20 et 30 nucléotides en aval.

12. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il est constitué par le promoteur COMTII de tabac défini par la séquence nucléotidique en amont de l'ATG représentée par l'identificateur de séquence 1 (SEQ ID NO 1), les séquences capables de s'hybrider de manière sélective à ladite séquence et les séquences homologues.

13. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est constitué, par la séquence comprise entre les nucléotides 557 et 1796 de l'identificateur de séquence n° 1

14. Gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante et une séquence de régulation en 3', caractérisé en ce que la séquence de régulation en 5' comprend le fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 13.

15. Gène chimère selon la revendication 14, caractérisé en ce que la séquence codante comprend une séquence codante pour un gène rapporteur ou une séquence codante pour une protéine d'intérêt.

16. Gène chimère selon la revendication 15, caractérisé en ce que la protéine d'intérêt est une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux maladies ou aux insectes.

17. Gène chimère selon la revendication 16, caractérisé en ce que la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines.

18. Gène chimère selon la revendication 17, caractérisé en ce que le peptide éliciteur fongique est la mégaspermine.

19. Gène chimère selon la revendication 18, caractérisé en ce que la

mégaspermine est représentée par l'identificateur de séquence n° 13 (SEQ ID 13).

20. Gène chimère selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'ADN représentée par l'identificateur de séquence n° 14 (SEQ ID 14).

21. Gène chimère fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes  
5 caractérisé en ce qu'il comprend dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur inductible, une séquence codante pour un éliciteur et une séquence de régulation en 3'.

22. Gène chimère selon la revendication 21, caractérisé en ce l'éliciteur est défini dans les revendications 17 à 19.

10 23. Gène chimère selon l'une des revendications 21 ou 22, caractérisé en ce que le promoteur inductible est choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB, le promoteur HMG2, le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou  
15 le promoteur de l'amino cyclopropane carboxylate syntase (ACC synthase) de pomme.

24. Vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, caractérisé en ce qu'il contient au moins un gène chimère selon les revendications 14 à 23.

25. Procédé de transformation des cellules végétales, caractérisé en ce qu'il  
20 consiste à intégrer au génome des dites cellules végétales au moins un gène chimère selon l'une des revendications 14 à 23.

26. Cellules végétales transformées caractérisées en ce qu'elles comprennent un gène chimère selon l'une des revendications 14 à 23.

27. Plantes transformées caractérisées en ce qu'elles comprennent un gène  
25 chimère selon les revendications 14 à 23.

28. Plantes, caractérisées en ce qu'elles contiennent des cellules transformées selon la revendication 26 ou obtenues par le procédé selon la revendication 25.

29. Plantes selon la revendication 28, caractérisées en ce qu'elles sont régénérées à partir des cellules transformées selon la revendication 19 ou obtenues par le  
30 procédé selon la revendication 18.

30. Plantes issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées selon la revendication 29.

31. Plantes selon l'une des revendications 27 à 30, caractérisées en ce qu'elles sont du type monocotylédones, en particulier les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs, ou dicotylédones, en particulier le tabac, la soja, le colza, le coton, le tournesol, la betterave, le trèfle.

5 32. Graines des plantes selon l'une des revendications 27 à 31.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC AGRO
- (B) RUE: 14-20 Rue Pierre BAIZET
- (C) VILLE: LYON
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69009

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 26

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1863 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc\_signal
- (B) EMPLACEMENT: 667..672
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= "boite W inverse"

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc\_signal
- (B) EMPLACEMENT: 820..830
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= "boite L inverse"

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: enhancer
- (B) EMPLACEMENT: 845..852

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc\_signal
- (B) EMPLACEMENT: 1034..1047
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= "boite P"

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc\_signal
- (B) EMPLACEMENT: 1221..1226
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= "boite G"

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc\_signal
- (B) EMPLACEMENT: 1343..1356
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= "boite L inverse"

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc\_signal

- (B) EMPLACEMENT:1369..1374  
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite A"
- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: misc\_signal  
(B) EMPLACEMENT:1377..1382  
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite GT"
- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: misc\_signal  
(B) EMPLACEMENT:1483..1488  
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite GT"
- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: misc\_signal  
(B) EMPLACEMENT:1562..1567  
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite W inverse"
- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: misc\_signal  
(B) EMPLACEMENT:1600..1614  
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite L"
- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: CAAT\_signal  
(B) EMPLACEMENT:1675..1679
- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: misc\_signal  
(B) EMPLACEMENT:1681..1690  
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite E"
- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: CAAT\_signal  
(B) EMPLACEMENT:1695..1699
- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: TATA\_signal  
(B) EMPLACEMENT:1735..1739
- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: rep\_origin  
(B) EMPLACEMENT:1772

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

|  |     |
|--|-----|
| AAAGTTAGGG ACAATCTATA GTGTCACAAA GTTGCTTATG GCTTTTGGTT CAGATAAAGA  | 60  |
| AAAAGAACAG CATTTTAATT TGTGAAGATT AGTCTGAGCA GAATTTTCATT GTATCTAGAA | 120 |
| AGAAATTGAA AAAAGAAATA TTCTATTTCA CTATTATGTT AGGTGCAACT ATATCATCAC  | 180 |
| CATGGAAAAG CCGGAGTAAA AAGAGAACGT AGAGGAGATT TCATGATTTG ATTGAGAATA  | 240 |
| TAATATATTA TTTTTTTGTA ATTCCACACA AAGATTAAGA AAATGATCTG ATCAATGATG  | 300 |
| GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGGGA ACTA TGACATTAAT ATAAATTTGT CGCTGCCTAT | 360 |
| AAAGACCCTA TCTATCTATC TATCTATCTA TATATATATA TATATATATA TATATATATA  | 420 |
| TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATAAG CGCTAATATT TGATTATTTT  | 480 |
| TTAAAAATAT TTATAAGTAT ATATGAAATT TTTGACGAAA TTTTGTGTG ACCGTGACCC   | 540 |
| CTCAACCTAT AGTGTGCGTC CACCTGTGCC AACAATATAG AGACAATTTG CTCGTATAGT  | 600 |



|  |      |
|--|------|
| CAGAAAGAGT GTTTTACTTT TTAGTTGCTT TTTAGTGAAT CTACTCGGTA TAAAGTTAAA  | 660  |
| TTAGTGGGTC AATAAGTCGG GTGAATAGTT AAAGAAAACA GTGGTGAGTT TAGCTGTCAA  | 720  |
| ATAATTTCTT CTTTTTCTTG TTTTCACATT AGAAATCAAA ATAAACACA AGCTTTTTTGT  | 780  |
| ATTTATTTTA ACACAAGCTA ATTATATGTT TATATGCTGG TTAGGTGAAG TAAAGCATGT  | 840  |
| TATATGAGGA AAGTACGAAG AAAATGTGCC AATTGTCGTG TACAGCAAAG CAGCCAGCAC  | 900  |
| AAGCAAATTC GCACTTGATA AGTGGCTAAG TCCACTTTCT AGTGGACCTA GTGGTTCACT  | 960  |
| AACTTTTACC AAAAAGGCAA TAATTTGCAA TTCAAAAAGA AAAAAGGAAA AAAGAAAAC   | 1020 |
| AGACAGACTT TAACACACCA ACTCCACAG GAAGCAACAA TGCAACTCAC AAAAGGAAAC   | 1080 |
| CGAGTTTTTC CGCGACGGAT CTAGAATTTG GGTTCACTCT TTAGCGTTTT TCGTATTAAA  | 1140 |
| CTCATTATAT TTGTATAATT ATGGGTTTAT ATTTTTTATT TATTGTAATT TTTGTAAAT   | 1200 |
| TTTATATATA AGTGATACT CCACGTCTCC GGATACTACA TTAGCCTCTA GGGTTCTTAA   | 1260 |
| TACTCTTGTT AAATTGTCCA GGCTCCAAAC GCATGTTTCGT TTCAATTTTA ACGGATGTTT | 1320 |
| CCGAACAAC CCAAATGTTT AATGTTAGGT GTGTTTGGTG TTAAGCTTCC GTCCTAGGTT   | 1380 |
| AATAGAATAG ATAATTGTTG TTTCTTATAT AGTTTGAAC AATCGTCGCC ATAACTAAT    | 1440 |
| TTTTAGGATG GAAGCTAATT TTTAGGATGG AGTACAGCCT AAGGTTAAAA TATACTATA   | 1500 |
| AAAAATATCC ATAAAAGGTG AAATTTAATT AGTAACATGA AAAGATAAAA CTAGTGTTAT  | 1560 |
| CGGTCAAAC TTCAAAAGAG AAAGAAATAA CTAGACAAAC TTCAACAACC AACCTGCCCC   | 1620 |
| ACATGCTACT GTGCAATTGA AAAATAAACA AAAGAGAACC AGACAATATT TCAACCAATA  | 1680 |
| TTCCATCAAG AAAACCAATT ATGACAATTC TTAACCAAAG TCACAATAA CACTTATAAA   | 1740 |
| AAGCACTAAC TCAACTGTAC ATGATTGTGA AGCCTAACAA AAACACTCTA AAAGGAAAAG  | 1800 |
| ACTACGAGAA TAATTACACT ACAACTCTTA TAGCTAATTC TTGTCTCAAG ATTTTCAGCT  | 1860 |
| ATG  | 1863 |

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5371 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: promoteur
- (B) EMPLACEMENT: 1..1860

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: rep origine
- (B) EMPLACEMENT: 1772

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: exon

(B) EMPLACEMENT:1861..2281

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: intron

(B) EMPLACEMENT:2282..3633

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: exon

(B) EMPLACEMENT:3634..3944

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: intron

(B) EMPLACEMENT:3945..4726

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: exon

(B) EMPLACEMENT:4727..5089

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: terminateur

(B) EMPLACEMENT:5090..5371

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

|  |      |
|--|------|
| AAAGTTAGGG ACAATCTATA GTGTCACAAA GTTGCTTATG GCTTTTGGTT CAGATAAAGA  | 60   |
| AAAAGAACAG CATTTTAATT TGTGAAGATT AGTCTGAGCA GAATTTTCATT GTATCTAGAA | 120  |
| AGAAATTGAA AAAAGAAATA TTCTATTTCA CTATTATGTT AGGTGCAACT ATATCATCAC  | 180  |
| CATGGAAAAG CCGGAGTAAA AAGAGAACGT AGAGGAGATT TCATGATTTG ATTGAGAATA  | 240  |
| TAATATATTA TTTTTTTGTA ATTCCACACA AAGATTAAGA AAATGATCTG ATCAATGATG  | 300  |
| GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGGGAAC TAACATTAAT ATAAATTTGT CGCTGCCTAT    | 360  |
| AAAGACCCTA TCTATCTATC TATCTATCTA TATATATATA TATATATATA TATATATATA  | 420  |
| TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATAAG CGCTAATATT TGATTATTTT  | 480  |
| TTAAAAATAT TTATAAGTAT ATATGAAATT TTTGACGAAA TTTTGTGTG ACCGTGACCC   | 540  |
| CTCAACCTAT AGTGTGCGTC CACCTGTGCC AACAATATAG AGACAATTTG CTCGTATAGT  | 600  |
| CAGAAAGAGT GTTTTACTTT TTAGTTGCTT TTTAGTGAAT CTACTCGGTA TAAAGTTAAA  | 660  |
| TTAGTGGGTC AATAAGTCGG GTGAATAGTT AAAGAAAACA GTGGTGAGTT TAGCTGTCAA  | 720  |
| ATAATTTCTT CTTTTTCTTG TTTTCACATT AGAAATCAAA ATAAAACACA AGCTTTTTGT  | 780  |
| ATTTATTTTA ACACAAGCTA ATTATATGTT TATATGCTGG TTAGGTGAAG TAAAGCATGT  | 840  |
| TATATGAGGA AAGTACGAAG AAAATGTGCC AATTGTCGTG TACAGCAAAG CAGCCAGCAC  | 900  |
| AAGCAAATTC GCACTTGATA AGTGGCTAAG TCCACTTTCT AGTGGACCTA GTGGTTCACT  | 960  |
| AACTTTTACC AAAAAGGCAA TAATTTGCAA TTCAAAAAGA AAAAAGGAAA AAAGAAAAC   | 1020 |
| AGACAGACTT TAACACACCA ACTCCACAG GAAGCAACAA TGCAACTCAC AAAAGGAAAC   | 1080 |
| CGAGTTTTTC CGCGACGGAT CTAGAATTTG GGTTCATTCT TTACGCTTTT TCGTATTAAA  | 1140 |
| CTCATTATAT TTGTATAATT ATGGGTTTAT ATTTTTTATT TATTGTAATT TTTGTAAAAT  | 1200 |
| TTTATATATA AGTGTATACT CCACGTCTCC GGATACTACA TTAGCCTCTA GGGTTCTTAA  | 1260 |

|   |      |
|---|------|
| TACTCTTGTT AAATTGTCCA GGCTCCAAAC GCATGTTCGT TTCAATTTTA ACGGATGTTT   | 1320 |
| CCGAACAACT CCAAATGTTC AATGTTAGGT GTGTTTGGTG TTAAGCTTCC GTCCTAGGTT   | 1380 |
| AATAGAATAG ATAATTGTTG TTTCTTATAT AGTTTTGAAC AATCGTCGCC ATAAACTAAT   | 1440 |
| TTTTAGGATG GAAGCTAATT TTTAGGATGG AGTACAGCCT AAGGTAAAAA TATAACTATA   | 1500 |
| AAAAATATCC ATAAAAAGTG AAATTTAATT AGTAACATGA AAAGATAAAA CTAGTGTTAT   | 1560 |
| CGGTCAAACCT TTCAAAAGAG AAAGAAATAA CTAGACAAAC TTCAACAACC AACCTGCCCCA | 1620 |
| ACATGCTACT GTGCAATTGA AAAATAAACA AAAGAGAACC AGACAATATT TCAACCAATA   | 1680 |
| TTCCATCAAG AAAACCAATT ATGACAATTC TTAACCAAAG TCACAATAA CACTTATAAA    | 1740 |
| AAGCACTAAC TCAACTGTAC ATGATTGTGA AGCCTAACAA AAACACTCTA AAAGGAAAAG   | 1800 |
| ACTACGAGAA TAATTACACT ACAACTCTTA TAGCTAATTC TTGTCTCAAG ATTTTCAGCT   | 1860 |
| ATGGAATCCT CAACCAAAAG CCAAATACCA ACACAATCAG AAGAAGAGCG TAACTGCACA   | 1920 |
| TATGCCATGC AACTATTGTC ATCTTCAGTC CTCCCCTTTG TGTTCGATTC AACCAATTCAA  | 1980 |
| TTGGAAGTTT TTGAGATATT AGCCAAATCT AATGACACTA AACTTTCTGC TTCTCAAATT   | 2040 |
| GTTTCTCAAA TTCCTAACTG CACAAAACCT GAAGCACCTA CTATGTTAAA TAGGATGCTT   | 2100 |
| TATGTCTTGG CTAGTTACTC CTTGTTTACT TGTTCATTG TTGAAGATGA AAAAAATAAT    | 2160 |
| GGGGGCCAAA AAAGAGTGTA TGGTTTGTCA CAAGTGGGAA AATTCTTTGT TAAAAATGAA   | 2220 |
| AATGGTGCAT CAATGGGGCC ACTTTTGGCT TTGCTTCAAA ATAAAGTATT CATAAACAGC   | 2280 |
| TGGTAAGTTT TGTCTACTG TGTATTCTTT TTGCAGTGGC TGTATTGATT GGTTCCTTT     | 2340 |
| TTCACAAGAC AAGATTCTTA AGTTTTATTA CTTGTCGATT TATGTTAGTC GTATGTGCTA   | 2400 |
| GTGTTATTAT TCTCCATCTG ATCCTTTTAT TGGTCACTTT ACCTAAAAAT ATTGTTACAA   | 2460 |
| AACATTTGTC CTTCTAGAAA ATCAGGTATT ATTAATTTTT CAATTCCATC TTTATTACTC   | 2520 |
| CAATAGTGAA TATGGTTATT AATTAGTGTT TTAAGGAAGA TGTAAGGATA ATTTAATCAA   | 2580 |
| ATAGGATTTA TTATTAATGT TGTCAAAGAT TCTGGTGGAT GGATCGGAGA AAATTTCTTC   | 2640 |
| ATCTTAATCA GAGTTTGATG TTCGAGCCAC AGGAATGAAT TTGTTTTTAA TAGGGAGTAT   | 2700 |
| TTTCTCTTTG AATAGACCTT ACACAATAAA AGGACAACCC GGTACACTAA GCTTCCGTTA   | 2760 |
| TGCGCGGGGT TCGGGGAAAG GACCGCATCA CCAGGTCTAT TGTACGCAGC GTTACCCAAC   | 2820 |
| GTGAATCTAA ATTAATGAGA CTAAAAAATG GAACCCAACA CCAGTGAAAA CCAAAAAAAG   | 2880 |
| AAGCAAACCT TAGTGGATGG CTTGGAAAGA TCTTTCTTCT TGAATAACTT GGAGCGCTAT   | 2940 |
| ATATTAAGGC GTCGCAGCCG TTAGATACTT TCAAGAAGAA AGCTAAAAAA TGTTTTAAAG   | 3000 |
| TTACGGCGCT AGAATAATGA AATTTCTCTA TATATATAAT TCAAAAGTTA ATAATTTATT   | 3060 |
| CTCTTAACCT AAATCTATAT TATAAACTA TATTAAGTAA CTTCTGCCTA ATTTATAATA    | 3120 |
| TACAACTAAT GTTTTGAGAA AACAAAATAA CAACAACATC AAACCCAATG AAATCCCACA   | 3180 |
| AGTAGAGTTT GGGGAGGATA GTGTGTACGG AGACCTTACC CCTACCTTAT AAAGTTAAAG   | 3240 |

|            |            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| AGGCTGTTTT | CGAAAGACTC | TCGGCTCAAG | AACATTAAAA | ATTTGAGAAA | ACAAAATATA | 3300 |
| AATTCAAAAC | CTATATTAAG | TTTATAATCC | ATGGTATATT | ATATTGGCTT | AGTAATCTGA | 3360 |
| AATGAAAGAT | TTATGTTTGA | CTCCTCTAAA | CTTGTTTTTA | ATGCAAAAGA | GGCACAACAT | 3420 |
| ATATATTATA | AGTATCTTTT | TTTGGTTTCC | CACTGTGGCC | GCTAAATTCG | GATTCGCTGG | 3480 |
| AAGTGTCACA | TTGTTGGAGA | TGGGGGCAAC | GCTCACAACA | AAGACGATTC | TATAATTAGT | 3540 |
| GTTCGAACCT | GAAATTTTAG | TTAAAGATAA | AGAAGTACTT | ACCATAATGG | TAGATATGAT | 3600 |
| CATATCTGAC | TCTCTTTCTA | ATTTCAAATT | ACAGGTTTGA | ACTAAAAGAT | GCAGTTCTTG | 3660 |
| AAGGAGGAGT | TCCATTTGAC | AGGGTACACG | GTGTGCATGC | ATTTGAATAT | CCAAAATCGG | 3720 |
| ACCCAAAATT | CAATGATGTT | TTCAACAAGG | CAATGATCAA | TCACACAAC  | GATGTCATGA | 3780 |
| AAAAAATACT | TGAAAATTAC | AAAGGTTTTG | AGAACCTTAA | AACTTTGGTT | GATGTTGGAG | 3840 |
| GTGGTCTTGG | AGTTAACCTC | AAGATGATTA | CATCTAAATA | CCCCACAATT | AAGGGCACTA | 3900 |
| ATTTTGATTT | GCCACATGTT | GTTCAACATG | CCCCTTCTTA | TCCTGGTACC | TTCTCTCGTT | 3960 |
| CTTATTTTGT | TGTTTATTAT | ATTTACTTCG | ATCATCAGGT | CTAGGTCTGT | CAAGTTAAAT | 4020 |
| TCGTTCTCAA | AAAAGTTTAT | AAAGGTTTTG | AACTCCATCA | CCTATTGCTT | TAGGATTTTG | 4080 |
| AGTTGTATGC | TCTGAGTCTT | GCGCATGGTA | TCATAGTCAA | TTTATTTAAG | CTCGTTATTG | 4140 |
| CACTTGTGAA | TTCTATTATA | TAAGGAGTAA | GCCTACCAA  | AAGGAGCGAA | AATATTTTCC | 4200 |
| AAAACCTCTT | TTAAACCTTC | CTCACCCCAT | TCCCCTCTCC | CCTCTCCCCC | AACACCACCC | 4260 |
| ACCACCCCAA | CTCCCCCGTC | TTAGTTTTTT | TATTTATCCT | GGACTTTCTT | ATATTTTATG | 4320 |
| CTTTCCTTTA | ATTGAACTCT | TGTAACATAA | CCATTTGCCC | CCCACCCTAT | AGTGTTTGCC | 4380 |
| TAAATTTTAT | ATTTTTCAAA | ATAATATTTT | CTATTTACTA | ATTAAACATT | AGAAAATATT | 4440 |
| TTTCGGATTT | TTTTCCACTC | ACCAACCAAG | CATGGGAAAA | TAGTGATAAA | ACTACTCATT | 4500 |
| TTTCAAAATA | ATATTTTCAA | GGAAAACATT | TTCCTTTATA | CCAAATACCC | TTACTCTTGT | 4560 |
| ATACAAATCT | TCATGTCGAT | GATCTTGCAA | TATATATACA | TGTATATGTA | TGATTTGATA | 4620 |
| AACCACATGA | ACAAAATGGT | TGAGCTCTGC | GAATTGTGAT | ATATGATTTG | CTTATGTGTT | 4680 |
| GTGCACTATC | AATTACTTAA | ATTAAACTTC | ATCTAATAAT | ATTGCAGGGG | TGGAACATGT | 4740 |
| TGGGGGAGAT | ATGTTTGAAA | GTGTTCCAGA | AGGAGATGCT | ATTTTTATGA | AGTGATTCTT | 4800 |
| TCATGACTGG | AGTGATAGTC | ACAACCTCAA | GTTGCTAAAG | AACTGCTACA | AGGCTCTACC | 4860 |
| AGACAATGGA | AAGGTGATTG | TTGTTGAGGC | CATTTTACCA | GTGAAACCAG | ACATTGACAC | 4920 |
| CGCAGTGGTT | GGCGTTTCGC | AATGTGATTT | GATCATGATG | GCTCAAAATC | CTGGAGGCAA | 4980 |
| AGAGCGATCG | GAAGAGGAGT | TTCGAGCCTT | GGCTACTGAA | GCTGGATTCA | AAGGCGTTAA | 5040 |
| CTTAATATGT | TGTGTCTGTA | ATTTTTGGGT | CATGGAATTC | TGCAAGTAGA | TTTCTACTGT | 5100 |
| ACATTGAGTT | TCTACTACTC | TTGAGTATCC | ATTTATGGCA | ATCTGGGACT | GGAATTGCAG | 5160 |
| CTTAGTCCAG | ATTGAACATT | GATATTCCTA | ATAATATTTT | TATTATTTCC | CTTGTTTATT | 5220 |

TCTCTTGTAT GAAAGGATGT CATTTTGAGT ATTGATAATC ATGTTCTCTA GGACAGAAAT 5280  
 TGTAACCTTG TCCAACCTTA TTGATATTCC TAGTAAGATT TATATGACAT GTGTCTCTGG 5340  
 TTTGAGAAGA GTTTCATAT CTACAGACGG G 5371

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1095 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1..1095

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

|   |     |
|---|-----|
| ATG GAA TCC TCA ACC AAA AGC CAA ATA CCA ACA CAA TCA GAA GAA GAG | 48  |
| Met Glu Ser Ser Thr Lys Ser Gln Ile Pro Thr Gln Ser Glu Glu Glu |     |
| 1 5 10 15   |     |
| CGT AAC TGC ACA TAT GCC ATG CAA CTA TTG TCA TCT TCA GTC CTC CCC | 96  |
| Arg Asn Cys Thr Tyr Ala Met Gln Leu Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro |     |
| 20 25 30  |     |
| TTT GTG TTG CAT TCA ACA ATT CAA TTG GAA GTT TTT GAG ATA TTA GCC | 144 |
| Phe Val Leu His Ser Thr Ile Gln Leu Glu Val Phe Glu Ile Leu Ala |     |
| 35 40 45  |     |
| AAA TCT AAT GAC ACT AAA CTT TCT GCT TCT CAA ATT GTT TCT CAA ATT | 192 |
| Lys Ser Asn Asp Thr Lys Leu Ser Ala Ser Gln Ile Val Ser Gln Ile |     |
| 50 55 60  |     |
| CCT AAC TGC ACA AAA CCT GAA GCA CCT ACT ATG TTA AAT AGG ATG CTT | 240 |
| Pro Asn Cys Thr Lys Pro Glu Ala Pro Thr Met Leu Asn Arg Met Leu |     |
| 65 70 75 80   |     |
| TAT GTC TTG GCT AGT TAC TCC TTG TTT ACT TGT TCC ATT GTT GAA GAT | 288 |
| Tyr Val Leu Ala Ser Tyr Ser Leu Phe Thr Cys Ser Ile Val Glu Asp |     |
| 85 90 95  |     |
| GAA AAA AAT AAT GGG GGC CAA AAA AGA GTG TAT GGT TTG TCA CAA GTG | 336 |
| Glu Lys Asn Asn Gly Gly Gln Lys Arg Val Tyr Gly Leu Ser Gln Val |     |
| 100 105 110   |     |
| GGA AAA TTC TTT GTT AAA AAT GAA AAT GGT GCA TCA ATG GGG CCA CTT | 384 |
| Gly Lys Phe Phe Val Lys Asn Glu Asn Gly Ala Ser Met Gly Pro Leu |     |
| 115 120 125   |     |
| TTG GCT TTG CTT CAA AAT AAA GTA TTC ATA AAC AGC TGG TTT GAA CTA | 432 |
| Leu Ala Leu Leu Gln Asn Lys Val Phe Ile Asn Ser Trp Phe Glu Leu |     |
| 130 135 140   |     |
| AAA GAT GCA GTT CTT GAA GGA GGA GTT CCA TTT GAC AGG GTA CAC GGT | 480 |
| Lys Asp Ala Val Leu Glu Gly Gly Val Pro Phe Asp Arg Val His Gly |     |
| 145 150 155 160   |     |
| GTG CAT GCA TTT GAA TAT CCA AAA TCG GAC CCA AAA TTC AAT GAT GTT | 528 |
| Val His Ala Phe Glu Tyr Pro Lys Ser Asp Pro Lys Phe Asn Asp Val |     |
| 165 170 175   |     |

|   |      |
|---|------|
| TTC AAC AAG GCA ATG ATC AAT CAC ACA ACT GTA GTC ATG AAA AAA ATA<br>Phe Asn Lys Ala Met Ile Asn His Thr Thr Val Val Met Lys Lys Ile<br>180 185 190     | 576  |
| CTT GAA AAT TAC AAA GGT TTT GAG AAC CTT AAA ACT TTG GTT GAT GTT<br>Leu Glu Asn Tyr Lys Gly Phe Glu Asn Leu Lys Thr Leu Val Asp Val<br>195 200 205     | 624  |
| GGA GGT GGT CTT GGA GTT AAC CTC AAG ATG ATT ACA TCT AAA TAC CCC<br>Gly Gly Gly Leu Gly Val Asn Leu Lys Met Ile Thr Ser Lys Tyr Pro<br>210 215 220     | 672  |
| ACA ATT AAG GGC ACT AAT TTT GAT TTG CCA CAT GTT GTT CAA CAT GCC<br>Thr Ile Lys Gly Thr Asn Phe Asp Leu Pro His Val Val Gln His Ala<br>225 230 235 240 | 720  |
| CCT TCC TAT CCT GGG GTG GAA CAT GTT GGG GGA GAT ATG TTT GAA AGT<br>Pro Ser Tyr Pro Gly Val Glu His Val Gly Gly Asp Met Phe Glu Ser<br>245 250 255     | 768  |
| GTT CCA GAA GGA GAT GCT ATT TTT ATG AAG TGG ATT CTT CAT GAC TGG<br>Val Pro Glu Gly Asp Ala Ile Phe Met Lys Trp Ile Leu His Asp Trp<br>260 265 270     | 816  |
| AGT GAT AGT CAC AAC CTC AAG TTG CTA AAG AAC TGC TAC AAG GCT CTA<br>Ser Asp Ser His Asn Leu Lys Leu Leu Lys Asn Cys Tyr Lys Ala Leu<br>275 280 285     | 864  |
| CCA GAC AAT GGA AAG GTG ATT GTT GTT GAG GCC ATT TTA CCA GTG AAA<br>Pro Asp Asn Gly Lys Val Ile Val Val Glu Ala Ile Leu Pro Val Lys<br>290 295 300     | 912  |
| CCA GAC ATT GAC ACC GCA GTG GTT GGC GTT TCG CAA TGT GAT TTG ATC<br>Pro Asp Ile Asp Thr Ala Val Val Gly Val Ser Gln Cys Asp Leu Ile<br>305 310 315 320 | 960  |
| ATG ATG GCT CAA AAT CCT GGA GGC AAA GAG CGA TCG GAA GAG GAG TTT<br>Met Met Ala Gln Asn Pro Gly Gly Lys Glu Arg Ser Glu Glu Glu Phe<br>325 330 335     | 1008 |
| CGA GCC TTG GCT ACT GAA GCT GGA TTC AAA GGC GTT AAC TTA ATA TGT<br>Arg Ala Leu Ala Thr Glu Ala Gly Phe Lys Gly Val Asn Leu Ile Cys<br>340 345 350     | 1056 |
| TGT GTC TGT AAT TTT TGG GTC ATG GAA TTC TGC AAG TAG<br>Cys Val Cys Asn Phe Trp Val Met Glu Phe Cys Lys<br>355 360                                     | 1095 |

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 1

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CGTTTCGCAA TGTGATTGTA TC

22

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CTCAAAATGA CATCCTTTCA TAC

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CTGAAGATGT CAATAGTTGC ATGGC

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PAS1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGTCTAGAGG GCCTTTTAGA GTGTTTTTGT TAG

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

AAAGTCGACC GTCCACCTGT GCCAACAAT

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TGTTTGGTGT TATGCTTCG TCCT

24

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 292 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS3

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AAAAAGCTTT TTTAGGATGG AGTACAGCC

29

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS4

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

TTTAAGCTTA AAGAGAACCA GACAATATT

29

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 354 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1..60
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= preproteine

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 61..60
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= preproteine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| atg | aac | ttc | acc | gct | ctg | ctc | gct | gcc | gtc | gcc | gcc | gcc | ttg | gtc | gga | 48  |
| Met | Asn | Phe | Thr | Ala | Leu | Leu | Ala | Ala | Val | Ala | Ala | Ala | Leu | Val | Gly |     |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |     |
| tct | gcc | aac | gcc | acc | gcg | tgc | acc | gcc | acc | cag | cag | acc | gct | gcg | tac | 96  |
| Ser | Ala | Asn | Ala | Thr | Ala | Cys | Thr | Ala | Thr | Gln | Gln | Thr | Ala | Ala | Tyr |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
| aag | aca | ctc | gtg | agc | atc | ctg | tgc | gac | gcg | tgc | ttc | aac | aag | tgc | tct | 144 |
| Lys | Thr | Leu | Val | Ser | Ile | Leu | Ser | Asp | Ala | Ser | Phe | Asn | Lys | Cys | Ser |     |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| acg | gat | tgc | ggc | tac | tcc | atg | ctg | acg | gcc | aag | gcc | ctc | ccc | acc | acg | 192 |
| Thr | Asp | Ser | Gly | Tyr | Ser | Met | Leu | Thr | Ala | Lys | Ala | Leu | Pro | Thr | Thr |     |
|     |     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |



|   |     |
|---|-----|
| gcg cag tac aag ctc atg tgc gcg tcc acg gca tgc aac acc atg atc | 240 |
| Ala Gln Tyr Lys Leu Met Cys Ala Ser Thr Ala Cys Asn Thr Met Ile |     |
| 65 70 75 80   |     |
| aag aag atc gtg acg ctg aac ccg ccc aac tgc gac ctg acg gtg ccc | 288 |
| Lys Lys Ile Val Thr Leu Asn Pro Pro Asn Cys Asp Leu Thr Val Pro |     |
| 85 90 95  |     |
| acg agc ggc ctg gtg ctc aac gtg tac tcg tac gcg aac ggc ttc tcg | 336 |
| Thr Ser Gly Leu Val Leu Asn Val Tyr Ser Tyr Ala Asn Gly Phe Ser |     |
| 100 105 110   |     |
| gac aag tgc tcg tcg ctg   | 354 |
| Asp Lys Cys Ser Ser Leu   |     |
| 115   |     |

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 354 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..294

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

|   |     |
|---|-----|
| acc gcg tgc acc gcc acc cag cag acc gct gcg tac aag aca ctc gtg | 48  |
| Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gln Gln Thr Ala Ala Tyr Lys Thr Leu Val |     |
| 1 5 10 15   |     |
| agc atc ctg tcg gac gcg tcg ttc aac aag tgc tct acg gat tcg ggc | 96  |
| Ser Ile Leu Ser Asp Ala Ser Phe Asn Lys Cys Ser Thr Asp Ser Gly |     |
| 20 25 30  |     |
| tac tcc atg ctg acg gcc aag gcc ctc ccc acc acg gcg cag tac aag | 144 |
| Tyr Ser Met Leu Thr Ala Lys Ala Leu Pro Thr Thr Ala Gln Tyr Lys |     |
| 35 40 45  |     |
| ctc atg tgc gcg tcc acg gca tgc aac acc atg atc aag aag atc gtg | 192 |
| Leu Met Cys Ala Ser Thr Ala Cys Asn Thr Met Ile Lys Lys Ile Val |     |
| 50 55 60  |     |
| acg ctg aac ccg ccc aac tgc gac ctg acg gtg ccc acg agc ggc ctg | 240 |
| Thr Leu Asn Pro Pro Asn Cys Asp Leu Thr Val Pro Thr Ser Gly Leu |     |
| 65 70 75 80   |     |
| gtg ctc aac gtg tac tcg tac gcg aac ggc ttc tcg gac aag tgc tcg | 288 |
| Val Leu Asn Val Tyr Ser Tyr Ala Asn Gly Phe Ser Asp Lys Cys Ser |     |
| 85 90 95  |     |
| tcg ctg   | 294 |
| Ser Leu   |     |

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1620 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: promoteur COMTII  
(B) EMPLACEMENT:1..1263

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS Mégaspermine  
(B) EMPLACEMENT:1264..1630

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

```

cgtccacctg tgccaacaat atagagacaa ttgctcgta tagtcagaaa gagtgtttta 60
cttttttagtt gcttttttagt gaatctactc ggtataaagt taaatttagtg ggtcaataag 120
tcgggtgaat agttaagaa aacagtgggt agtttagctg tcaaataatt tcttcttttt 180
cttgttttca cattagaaat caaaataaaa cacaagcttt ttgtatttat tttaacacaa 240
gctaattata tgtttatatg ctggttaggt gaagtaaagc atgttatatg aggaaagtac 300
gaagaaaatg tgccaattgt cgtgtacagc aaagcagcca gcacaagcaa attcgcaact 360
gataagtggc taagtccact ttctagtgga cctagtgggt cactaacttt taccaaaaag 420
gcaataattt gcaattcaaa aagaaaaaag gaaaaaagaa aactagacag actttaacac 480
accaactccc acaggaagca acaatgcaac tcacaaaagg aaaccgagtt tttccgcgac 540
ggatctagaa tttgggttca ttctttacgc ttttctgtat taaactcatt atatttgtat 600
aattatgggt ttatatTTTT tatttattgt aatttttgta aaattttata tataagtgt 660
tactccacgt ctccggatag tacattagcc tctagggttc ttaatactct tgttaaattg 720
tccaggctcc aaacgcatgt tcggttcaat tttaacggat gtttccgaac aactccaaat 780
gttcaatgtt aggtgtgttt ggtgttaagc ttccgtccta ggttaataga atagataatt 840
gttgtttctt atatagtttt gaacaatcgt cgccataaac taatttttag gatggaagct 900
aatttttagg atggagtaca gcctaagggt aaaatataac tataaaaaat atccataaaa 960
ggtgaaattt aattagtaac atgaaaagat aaaactagtg ttatcgggtca aactttcaaa 1020
agagaaagaa ataactagac aaacttcaac aaccaacctg cccaacatgc tactgtgcaa 1080
ttgaaaaata aacaaaagag aaccagacaa tatttcaacc aatattccat caagaaaacc 1140
aattatgaca attcttaacc aaagtcacaa ctaacactta taaaagcac taactcaact 1200
gtacatgatt gtgaagccta acaaaaacac tctaaaaggc ctctagagga tccccggggt 1260
acc atg aac ttc acc gct ctg ctc gct gcc gtc gcc gcc gcc ttg gtc 1308
Met Asn Phe Thr Ala Leu Leu Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Val
1 5 10 15
gga tct gcc aac gcc acc gcg tgc acc gcc acc cag caa acc gct gcg 1356
Gly Ser Ala Asn Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gln Gln Thr Ala Ala
20 25 30

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| tac | aaa | aca | ctc | gtg | agc | atc | ctg | tcg | gac | gcg | tcg | ttc | aac | aag | tgc | 1404 |
| Tyr | Lys | Thr | Leu | Val | Ser | Ile | Leu | Ser | Asp | Ala | Ser | Phe | Asn | Lys | Cys |      |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |      |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| tct | acg | gat | tcg | ggc | tac | tcc | atg | ctg | acg | gcc | aag | gcc | ctc | ccc | acc | 1452 |
| Ser | Thr | Asp | Ser | Gly | Tyr | Ser | Met | Leu | Thr | Ala | Lys | Ala | Leu | Pro | Thr |      |
|     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |      |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| acg | gcg | cag | tac | aag | ctc | atg | tgc | gcg | tcc | acg | gca | tgc | aac | acc | atg | 1500 |
| Thr | Ala | Gln | Tyr | Lys | Leu | Met | Cys | Ala | Ser | Thr | Ala | Cys | Asn | Thr | Met |      |
|     |     | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     |      |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| atc | aaa | aaa | atc | gtg | acg | ctg | aac | ccg | ccc | aac | tgc | aac | ctg | acg | gtg | 1548 |
| Ile | Lys | Lys | Ile | Val | Thr | Leu | Asn | Pro | Pro | Asn | Cys | Asn | Leu | Thr | Val |      |
|     | 80  |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |      |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| ccc | acg | agc | ggc | ctg | gtg | ctc | aac | gtg | tac | tcg | tac | cca | aac | ggc | ttc | 1596 |
| Pro | Thr | Ser | Gly | Leu | Val | Leu | Asn | Val | Tyr | Ser | Tyr | Pro | Asn | Gly | Phe |      |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |      |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| tcg | gac | aag | tgc | tcg | tcg | ctg | taa |     |     |     |     |     |     |     |     | 1620 |
| Ser | Asp | Lys | Cys | Ser | Ser | Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PAS2

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CGCGGATCCC CTTT TAGAGT GTTTTGTTA GGC

33

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS5

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

ACGCGTCGAC GTTAGGGACA ATCTATAGTG TCAC

33

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS6

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

ACGCGTCGAC GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGG

34

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS7

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

ACGCGTCGAC GCTGGTTAGG TGAAGTAAAG CATG

34

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS8

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

ACGCGTCGAC GCATGTTATA TGAGGAAAGT ACG

33

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS9

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

ACGCGTCGAC GCAGCCAGCA CAAGCAAATT CGC

33

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS10

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

ACGCGTCGAC GACTTTAACA CACCAACTCC C

31

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS11

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

ACGCGTCGAC CGGATCTAGA ATTTGGGTTC ATTC

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS12

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

ACGCGTCGAC GTGTATACTC CACGTCTCCG GATAC

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS13

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

ACGCGTCGAC GTTCAATGTT AGGTGTGTTT GG

32

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PAS3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

CGCGGATCCG CTTAACACCA AACACACCTA ACATTG

36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

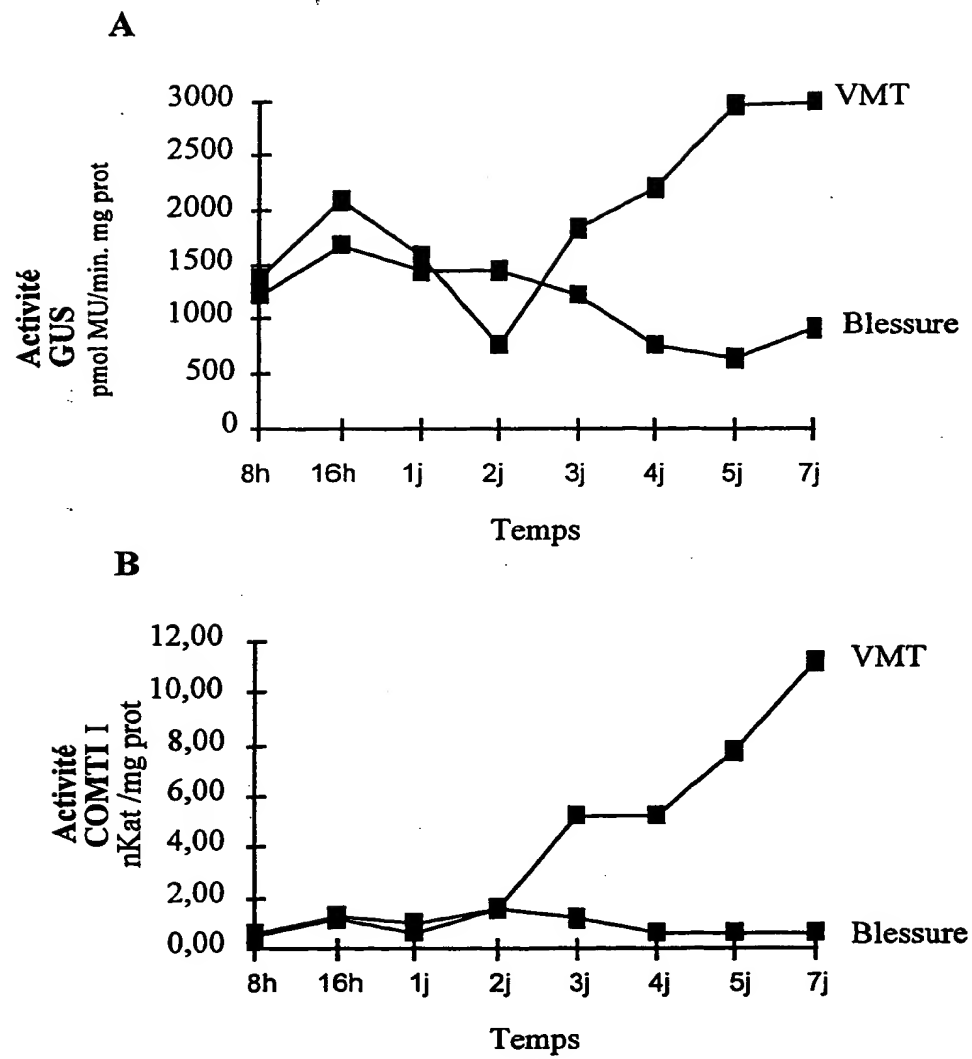
- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

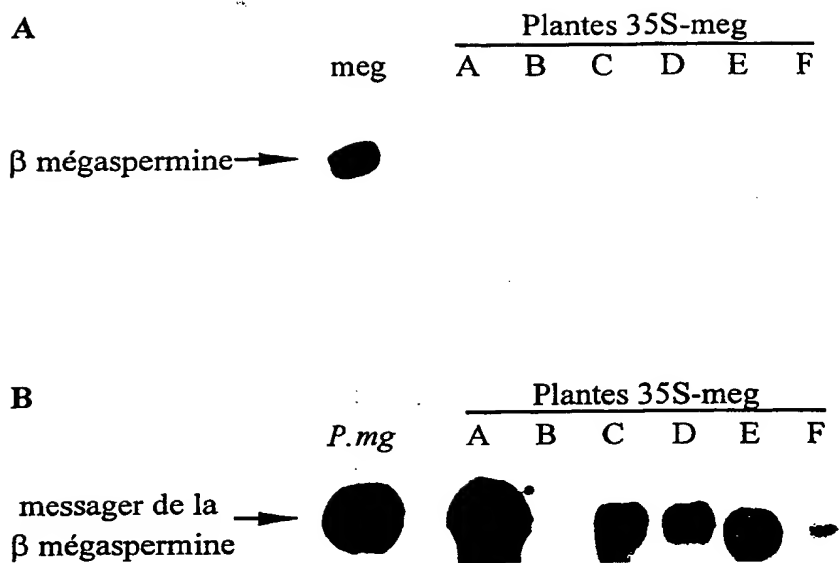
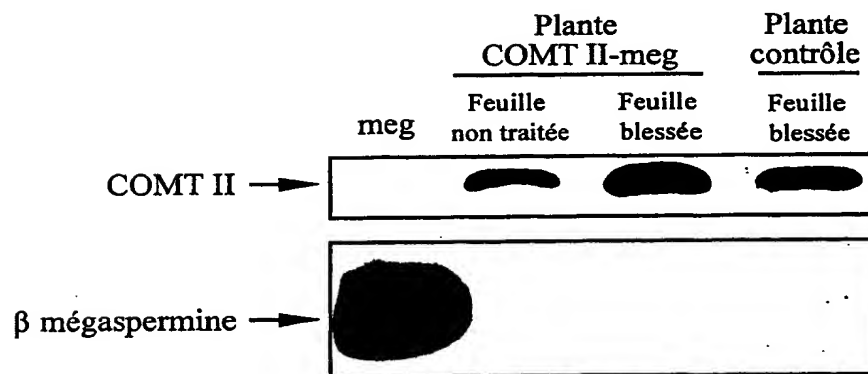
(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS14

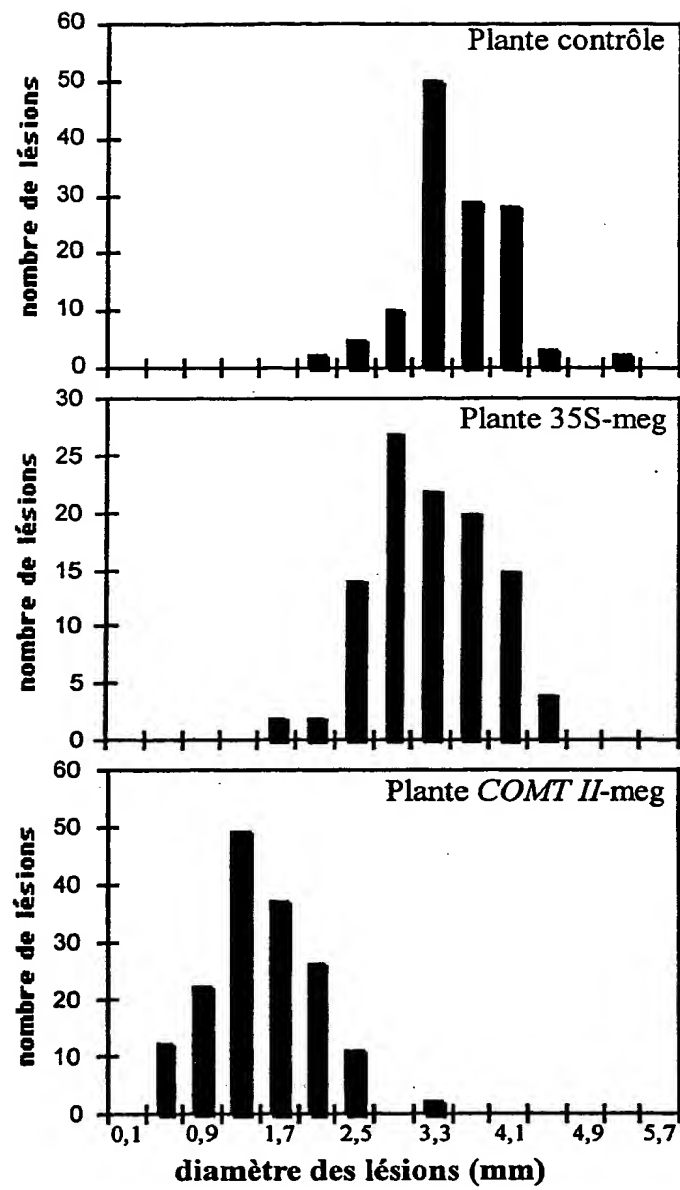
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

ACGCGTCGAC CAGTGGTGAG TTTAGCTGTC

30

**Fig 1**

**Fig 2****Fig 3**

**Fig 4**



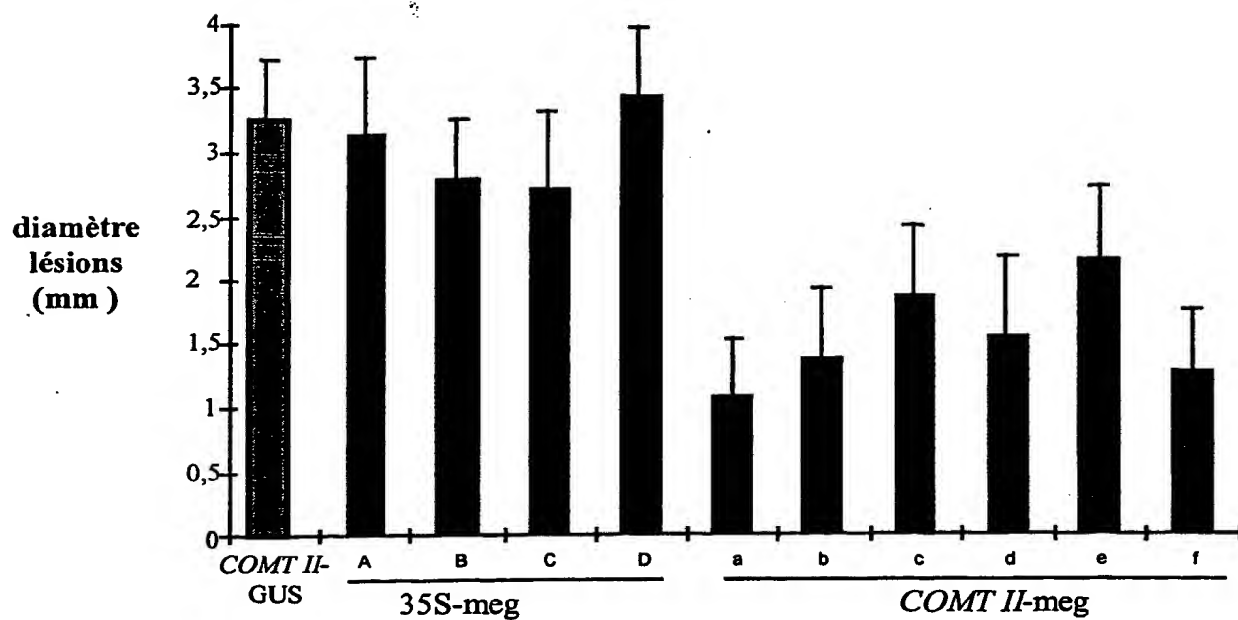


Fig 5

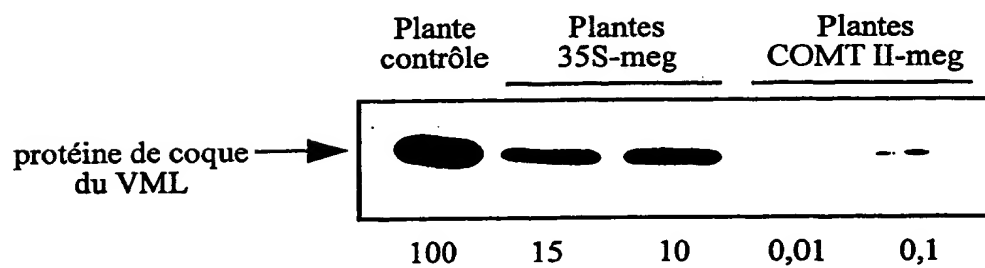
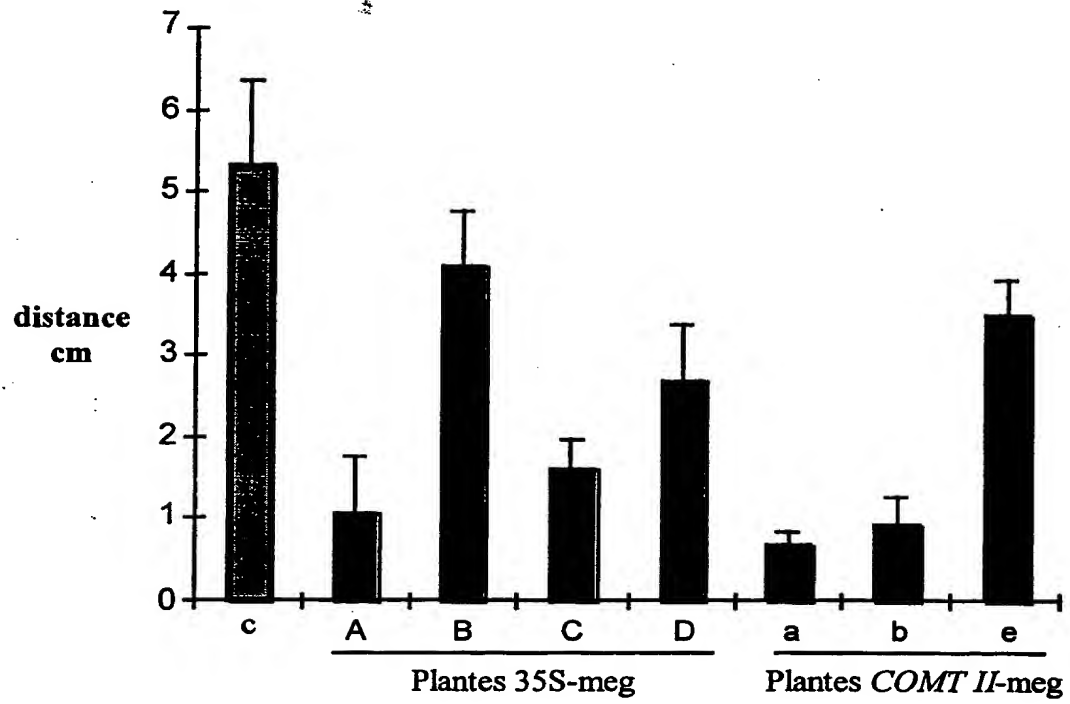


Fig 6

**Fig 7**



✓

